As "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" têm por finalidade a apresentação de trabalhos originais que contribuam para o progresso nos campos das Ciências Biológicas, Médicas e Químicas, elaborados por especialistas nacionais e estrangeiros.

São publicadas sob a orientação da Comissão Editorial, sendo que os conceitos emitidos são de inteira responsabilidade dos autores.

The "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" are the vehicle of comunication for original papers written by national and foreign specialists who contribute to the progress of Biological, Medical and Chemical Sciences.

They are published under the direction of the Editorial Board which assumes no responsability for statements and opinions advanced by contributors.

Indexado/Indexed: Biosis Data Base, Current Contents, Index Medicus.

Periodicidade: irregular
Permuta/Exchange: são feitas entre entidades governamentais, com publicações congêneres, mediante consulta prévia. Exchanges with similar publications can be settled with academic and governmental institutions through prior mutual agreement.

Endereço/Address. Instituto Butantan — Biblioteca. Av. Vital Brasil, 1.500
05503 — 900 — São Paulo, SP — Brasil
Telefone/Telephone: (011) 813-7222 — R. 2129 — Telex: (011) 83325 BUTA-BR
Telefax: (011) 815-1505

Governo do Estado de São Paulo
Secretaria de Estado da Saúde
Coordenação dos Institutos de Pesquisa
Instituto Butantan — São Paulo — SP — Brasil

MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN

Volume 54, número 2, 1992

São Paulo, SP — Brasil
1992

Mem. Inst. Butantan
v. 54, n. 2, 1992

SUMÁRIO/CONTENTS

Índice do v. 54

Mem. Inst. Butantan
v. 54, n. 2, p. 35-52, 1992

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF TOXINS PURIFIED FROM THE VENOM OF THE BRAZILIAN SCORPION *Tityus serrulatus* LUTZ AND MELLO.*

Lourival D. POSSANI[1, +]
Paul L. FLETCHER JR.[2]
Maryann FLETCHER[2]
Gustavo S. RODE[1]
Javier MOCHCA-MORALES[1]
Sylvia LUCAS[3]
Fredy V. CORONAS[1]
Alejandro C. ALAGON[1]
Brian M. MARTIN[4]

ABSTRACT: Venom from the scorpion *Tityus serrulatus* collected in four distinct geographical localities of Brazil was studied by gel electrophoresis, immunoelectrophoresis, Sephadex G-50 gel filtration and ion exchange chromatography. Lethality tests in mice were also conducted. None of these methods revealed a significant difference among these samples of venom. The Instituto Butantan venom of *T. serrulatus* has shown constant and reproducible biochemical and pharmacological properties, in our laboratories, for 18 years. The venom has several polypeptides toxic in mice, among the major toxic components are toxin gamma, III-8 and IV-5, which affect sodium channel permeability. The molecular weight of these toxins is in the order of 7,000. One of the

[1]Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca 62271, MEXICO.

[2]Department of Microbiology and Immunology, East Carolina University School of Medicine, Greenville, North Carolina 27858-4354, USA.

[3]Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1.500, São Paulo, SP 05503-900 BRASIL

[4]National Institute of Mental Health, Section on Molecular Neurogenetics, Clinical Neuroscience Branch., ADAMHA, Building 10 3D16. Bethesda Maryland, 20892 USA.

[+] Author to whom correspondence should be addressed:

Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM, Apartado Postal 510-3 Cuernavaca 62270 MEXICO Telephone (73)172799, FAX: (73)172388.

* Part of this article was used for the master of Sciences degree of G.S. Rode, Facultad de Químicas, UNAM, (1984).

Recebido para publicação em 9.10.1990 e aceito em 11.6.1992.

minor components is toxin II-9A, a shorter peptide (approx. 4,200 mol. weight) that modifies potassium permeability in axons. At least four additional minor toxic components were also purified with very similar amino acid sequences to the major components. *Tityus* venom was shown to exert an important secretagogue effect on guinea pig pancreas.

KEYWORDS: Scorpion toxins, *T. serrulatus*, pancreatitis, amino acid sequence.

INTRODUCTION

Toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello have been purified and studied by several independent groups of investigators[15,37,3,27,35], and several reviews[10,26] have been written. Tityustoxin and toxin gamma are the most thoroughly characterized. Toxin gamma was the first toxin for which a considerable part of the N-terminal amino acid sequence was reported[27,29] and the only one, thus far, for which the total amino acid sequence has been determined[31,6]. A brief summary of the different types of toxins present in the venom of *T. serrulatus* was reviewed by Possani[26]. Pharmacological and neurochemical studies were initially performed with Tityustoxin[10,14]. In recent years, both Tityustoxin and toxin gamma have been more extensively studied, and have been shown to affect Na^+ channel permeability of a variety of tissues[18,41] (and review)[20]. Initial work conducted by Bartholomew[5] reported that stings by scorpions of the genus *Tityus* can cause acute pancreatitis in humans.

Also the effect of the venom from *T. serrulatus* was demonstrated to cause pancreatitis in dogs[22]. Pioneer work by Novaes *et al*[25]. performed with tityustoxin has shown a clear effect of this purified toxin on the pancreatic secretion of the rat. Our preliminary experiments have shown several purified toxins to be active in secretory discharge of zymogen proteins of pancreatic lobules[12]. In the past it has been suggested that some of the differences found in the venom of *T. serrulatus* could be due to heterogeneity from scorpions of the same species collected in different geographical localities of Brazil[34]. There is need for a definitive study on the different toxic components present in the venom of *T. serrulatus* used at the Butantan Institute (Brazil). The purpose of this communication is to present the analysis of the venom of *T. serrulatus* from scorpions collected at different locations in Brazil by Butatan Institute, and at the same time to report some chemical and physiological charecteristics of toxins isolated from this venom.

MATERIALS AND METHODS

Venom Source.

Venom from *T. serrulatus* was obtained from the Instituto Butantan, São Paulo, Brazil. The scorpions were collected in several geographical localities of the State of Minas Gerais (Santa Barbara, Corrego Novo and Cataguases) and from the State of São Paulo (Aparecida do Norte). In Minas Gerais scorpions often are found in elevated places, mountains covered by low vegetation and grasses or in cracks and crevices of eroded land. They are also found in wooden support for the railroad track. In São Paulo they were mostly collected near houses.

Venom used for immunization at the Butantan Institute is normally obtained from scorpions of different areas, mainly from Santa Barbara and Corrego Novo, but for

this specific work, special care was taken to keep the venom separate for each area (see above). Venoms were dried in vacuum and kept refrigerated. Venom from *T. discrepans* was obtained from animals collected in the mountains surrouding Caracas City, in Venezuela. The venom was lyophilized and kept at -20°C. The dried venoms were dissolved in water and centrifuged 18,000 x g, for 10 min. The supernatants were directly used for comparative studies of whole venoms or for fractionation and characterization of toxic components.

Source of Chemicals.

Sephadex G-50 was obtained from Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden) and carboxymethyl-cellulose resins (CM-32) and diethylaminoethyl cellulose resins (DE-32) were from Whatman Inc., (Clifton, New Jersey). Spectrapor type 3 dialysis tubing was obtained from Spectrum Medical Industries (Los Angeles, CA.). Radiolabeled Iodoacetic acid came from New England Nuclear (Boston, Mass.), while dithiothreitol (DTT) was from Calbiochem Behring Corp. (La Jolla, CA). Most reagents for high performance liquid chromaography were from Pierce Chemical Co. (Rockford, Illinois) and chemicals and solvents for amino acid sequencing were from Beckman Instruments Inc. (Palo Alto, CA.), or from the sources indicated[29,31,23]. Additional chemicals were analytical grade reagents purchased from the following sources: paraformaldehyde, Eastman Kodak Co., (Rochester, NY); glutaraldehyde, Electron Microscopy Sciences (Fort Washington, PA); osmium tetroxide, Ernest F. Fullam, (Latham, NY); magnesium uranyl acetate, K&K Laboratories (Plainview, NY); epoxy resin, LX-112, Ladd Res. Industries (Burlington, VT); acrylamide and other reagents for gel electrophoresis, BioRad Laboratories (Richmond, CA).

Animals.

Adult albino mice (CD1 strain), approximately of 20 g body weight were used for lethality tests. Male albino Dunkin-Hartley guinea pigs weighing 250-350 g were used for microscopy studies.

Source of Anti-venom.

Horse anti-venom was obtained from Butantan Institute. The anti-venom (whole serum, undigested) was separated from the blood of horses immunized against the standard venom of *T. serrulatus*.

Lethality Tests.

Lethality tests in mice were conducted as described[27]. LD_{50} values were graphically determined from percentage of death mice versus logarithm of venom concentration. Basically, aliquots were injected intraperitoneally into 20 g mice that were observed for toxic effects. Among the symptoms of toxicity are: hyperexcitability, lacrimation, apnea, partial paralysis of the rear limbs, diarrhea, respiratory arrest and death.

Gel Electrophoresis and Immunoelectrophoresis.

The gel electrophoresis system of Reisfeld *et al.*[33], was used for comparison of venoms and assess purity of samples. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis were carried out in 1% agarose gels[17], and precipitates were visualized after dye staining of dried and washed gels[4].

Protein quantification.

Unless otherwise stated, protein content was determined spectrophotometrically, assuming that one unit at 280 nm (1 cm pathlength) is equivalent to 1 mg/ml protein concentration.

Separation Procedures.

Separation of soluble venom was basically performed according to previous publication by our group[29]. Briefly, the procedure includes a size exclusion chromatography and two consecutive steps of weak cation exchange chromatography through carboxymethyl-cellulose (CM-cellulose) resins. The first separation is performed in a column (0.9 x 200 cm) of Sephadex G-50 (medium), equilibrated with 20 mM ammoniumm acetate buffer, pH 4.7, from which four main fractions are obtained. Each one of the toxic fractions (II to IV) are further separated in CM-Cellulose resins at two different pH's. The first CM-Cellulose column (0.9 x 30 cm) is developed in ammonium acetate buffer, pH 4.7. In this step toxic components II-11, III-8 and III-10, and IV-5 are separated, corresponding to the main toxic components of the venom[29].

Each one of these components is subsequently purified by rechromatography of the dialyzed fractions through a second CM-Cellulose column equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0. A linear gradient from 0 M to 0.5 M NaCl in the same buffer is used to elute the toxic proteins in homogeneous form.

Enzymatic digestion mixtures of reduced and alkylated proteins used for amino acid sequencing were chromatographically separated into their component peptides by reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) on octadecylsilane columns developed with linear gradients up to 60% acetonitrile (containing 0.1% trifluoracetic acid). Isolated fractions were evaporated to dryness under vacuum in a Savant Speed-Vac Concentrator prior to amino acid analysis and sequenator application.

Hyaluronidase Purification.

Hyaluronidase was assayed by the method of Tolksdorf *et al.*[38]. The enzyme was purified from the venom of *T. serrulatus* by three consecutive steps: Sephadex G-50 gel filtration, ion-exchange chromatography through diethylaminoethyl-cellulose (DE-Cellulose) resins and affinity chromatography using Sepharose-concanavalin A. The hyaluronidase activity elutes in the first fraction of the Sephadex G-50 column (see Results). This fraction was loaded in a DE-Cellulose column, after dialysis against 50 mM TRIS-HCL buffer, pH 7.6. To the unbound material containing the hyaluronidase activity salts were added to give the final concentration of 1 mM CaCl, 1 mM MnCl and 1.0 M NaCl, in the same TRIS-HCl buffer, pH 7.6. This material was chromatographed through a Sepharose-concanavalin A column (10 ml) equilibrated with the same buffer mentioned above. Elution was obtained with stepwise gradients of the equilibration buffer containing 0.04 M and 0.5 M alpha-methyl-mannoside. Most of the enzyme was eluted with the second buffer (0.5 M mannoside).

Amino Acid Composition and Sequence Determination.

Amino acid composition was obtained with acid hydrolysates of purified proteins analyzed with a Durrum/Dionex D-502 automatic amino acid analyzer, as described[27,32]. Prior to amino acid sequence determination the toxins were either reduced and carboxymethylated or pyridylethylated, as described[27,29,31]. Determination of half-cystine was obtained after performic acid oxidation[24]. Tryptophan content was deduced from sequence data. Carboxypeptidase digestionn for the determination of carboxyl-terminal amino acid residues was carried out in 50 mM sodiumm acetate buffer, pH 3.5, with carboxypeptidase P (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN). Fragmentation of reduced and alkylated toxins by enzymatic cleavage with protease V8 from *Staphylococcus aureus* and/or tryp-

sin was obtained as described previously[31]. Peptides were separated by HPLC as mentioned above.

Primary sequence determination by automatic Edman degradation[11], was carried out either on a Beckman 890M (Palo Alto, CA) microsequencer or on polybrene-treated fiber disks in an automated gas phase sequenator (Mod. 470A, Applied Biosystems, Foster City, CA), equipped with an online PTH-analyzer, as described[31,23].

Light and Electron Microscopy.

Pancreatic lobules were prepared according to the method described by Scheele and Palade[36].

They were immersed in Karnovsky's fixative[16] (1% formaldehyde-2% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate, pH 7.4) and diced into 1.0 mm cubes, and allowed fo fix overnight at 4°C.

Tissues were postfixed 3 hours at 4°C in 1% osmium tetroxide in 0.1M sodium cacodylate, pH 7.4. Following *en bloc* stain in 0.5% magnesium uranyl acetate overnight, tissue blocks were dehydrated and embedded in LX-112 epoxy resin[21].

For light microscopy, sections 0.5 μm in thickness were stained with 1% toluidine blue in 1% sodium borate[21] and photographed in a Zeiss Standard 16 microscope equipped with a Zeiss MC63a photomicrographic camera.

For electron microscopy, thin sections of 800 A were stained with alkaline lead citrate[40], then examined and photographed in a JEOL 1200EX electron microscope.

RESULTS

The five different venom samples obtained from *T. serrulatus* collected in Aparecida do Norte, Cataguases, Corrego Novo, Santa Barbara and the standard Butantan venom (mainly a mixture of Santa Barbara and Corrego Novo) were assayed for toxicity in mice and for enzymatic activities. They were analyzed by electrophoresis in beta-alanine-urea-acetate gels and immunoelectrophoresis for comparative purposes. They were each separated under identical conditions by gel filtration and ion-exchange chromatography. Lethal dose (LD_{50} determinations performed with CD1 albino mice, by intraperitoneal injections, gave essentially the same results for each of the venom samples. For example, the venom from Santa Barbara has a LD_{50} of 21 $\pm$ 1μg/20 g mouse weight, while the standard venom gave 22 $\pm$ 1μg/20 g mouse weight. The only enzymatic activity found in all 5 samples of venom was hyaluronidase, which was further characterized (see below). The results of electrophoresis separation of venom from scorpions collected in different geographical localities are presented in Fig. 1. The same amount of protein (100 μg) was applied in each cylindrical tube for polyacrylamide gel separation. At least 14 components are visible when stained with coomassie blue; numbers 5, 10, 11, 12, 13 and 14 being the more intensely colored. The most basic components with faster eletrophoretic mobility correspond to toxic peptides. The venoms have very similar electrokinetic properties. A slight variation in the realtive intensity of certain colored bands might be present. Compare for example, band 2 and 10 of lane *c* with the others. In Fig. 2 are the immunoelectrophoretic analysis of the different venoms using horse anti-venom as the serum source. The longitudinal slot contained the serum, while the venoms were placed inthe lateral wells. Two plates were run in parallel. The results of Fig. 2A show no appreciable immunological differences among the venoms. Fig. 2B shows the result of *T. ser-*

POSSANI, L.D. et al. Structural and functional characteristics of toxins purified from the venom of the Brazilian scorpion **Tityus serrulatus** Lutz and Mello. **Mem. Inst. Butantan**, v. **54**, n. 2, p. 35-52, 1992.

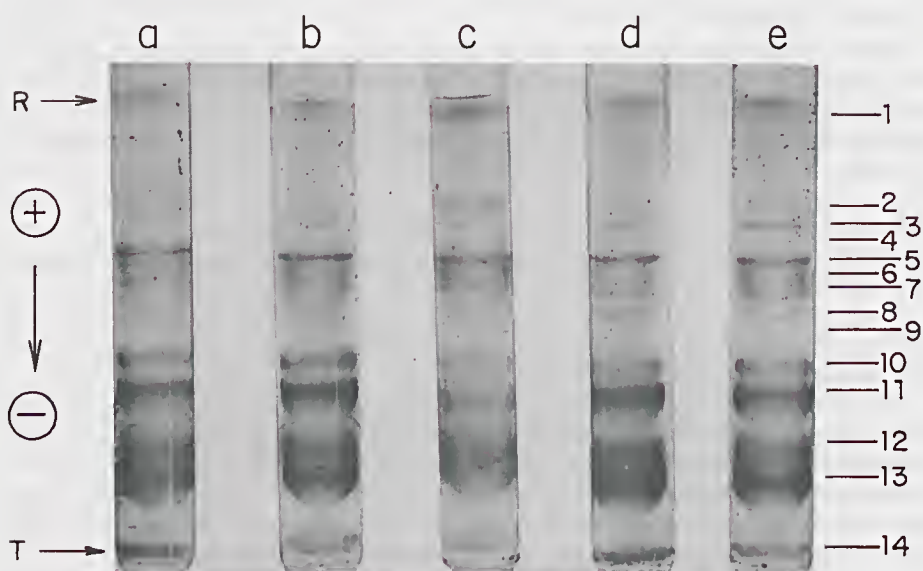



Fig.1. Gel electrophoresis of *T. serrulatus* venoms.
T. serrulatus venom from scorpions collected in Corrego Novo and Santa Barbara (a), Santa Barbara(b), Corrego Novo(c), Aparecida do Norte(d) and Cataguases(e) was applied to cylindrical gels of polyacrylamide (100 ug soluble venom in each lane) and run in the beta-alanine-acetate-urea electrophoresis system of Reisfeld *etal*[33]. Proteins and peptides run towards the cathode. A least 14 bands are visible; the most intensevely colored are number 5 and 10 to 14. R. designates origin of running gel, and T designates tracking dye.

rulatus venom and a control from another species of the same genus of scorpion *Tityus discrepans*). This figure (2B) shows a marked difference between *T. serrulatus* venom and *T. discrepans* collected in Venezuela. Fractionation of soluble venom by gel filtration on Sephadex G50 separates the venom from *T. serrulatus* into four main components (I to IV), see Fig. 3A, also Possani *et al.*[29] Very similar results were observed with venoms obtained in different geographical areas (data not shown). In Fig. 3 (B to D) are the results of further fractionation of the toxic fractions II, III and IV in CM-Cellulose columns.

Ten toxic sub-fractions were obtained: II-9 to II-11, III-7 to III-10, IV-5, IV-6 and IV-8, all toxic for mice. As discussed further below the toxic sub-fractions (ten) are not necessarily all different.

By this ion exchange separation method no appreciable differences were found among venoms of *T. serrulatus* collected in different geographical localities (data not shown). Final separation of pure polypeptides requires an additional chromatographic step. Usually a CM-Cellulose column equilibrated and run in 50 mM sodium-phosphate buffer, pH 6.0 is used. Dialyzed components II-11, III-8, III-10, and IV-5 were purified under these conditions to homogeneity.

Separation was obtained with a salt gradient from 0 to 0.5 M NaCl (see example in Fig. 3E).

During this chromatography small contaminants are eliminated; and the major toxic component is the main fraction of the chromatogram. The amino acid com-

position of the major toxins is compiled in Table I. Toxin II-11 (also called gamma toxin[27], and toxin III-10 are identical.

Recoveries obtained during these separation procedures are indicated in the legend of Fig. 3.

The homogeneity of toxic peptides was assessed by several criteria: shape of ion exchange columns (symmetrical peaks), gel electrophoresis[28], amino acid composition, profile of Sephadex G50 separation of reduced and alkylated tox-

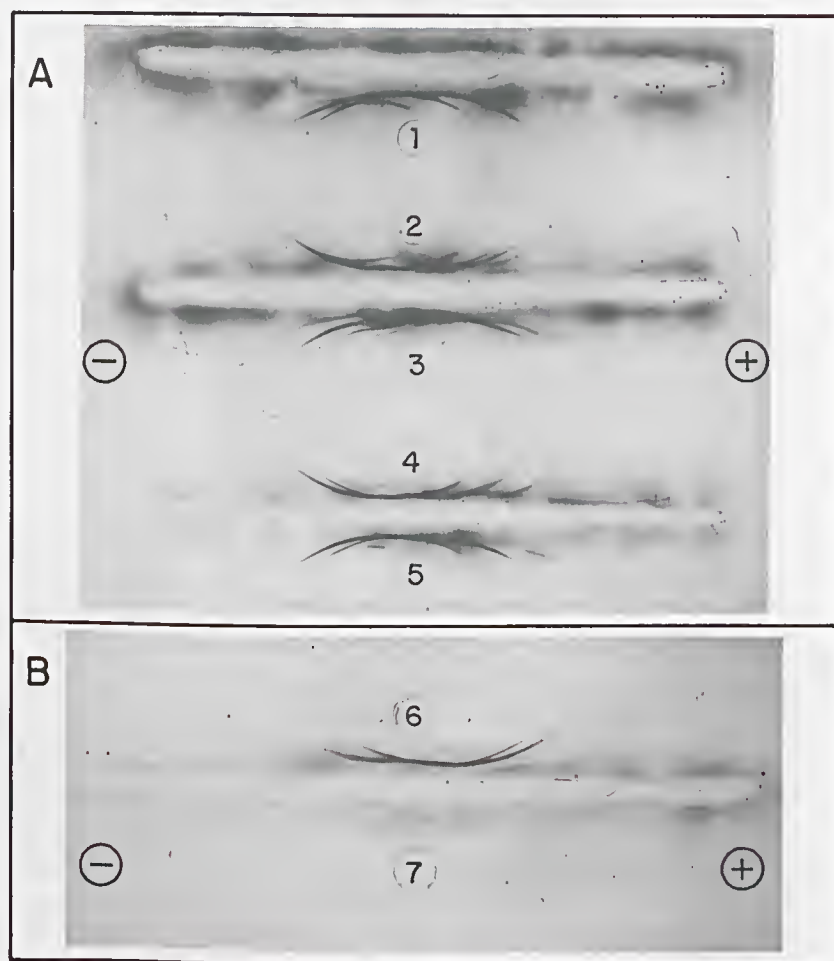



Fig.2. Immunoelectrophoresis of venoms from *T.serrulatus*.
PANEL A: Venom from scorpions collected in 5 different places were applied in agarose gel in 25 mM TRIS-Glycine buffer, pH 8.3 for electrophoresis and immunodiffusion, according to King *et al*17 . Wells contained 100 μg (in 10 ul) of each venom: Corrego Novo and Santa Barbara (1), Santa Barbara (2), Corrego Novo(3), Aparecida do Norte (4) and Cataguases (5). In the central slots 50 μl of horse anti-serum were used for immudiffusion.
PANEL B: Comparison of standard venom of *T. serrulatus* (6) and venom from T. *discrepans* (7) applied in the same conditions as in panel A.

POSSANI, L.D. et al. Structural and functional characteristics of toxins purified from the venom of the Brazilian scorpion **Tityus serrulatus** Lutz and Mello. **Mem. Inst. Butantan**, v. **54**, n. 2, p. 35-52, 1992.

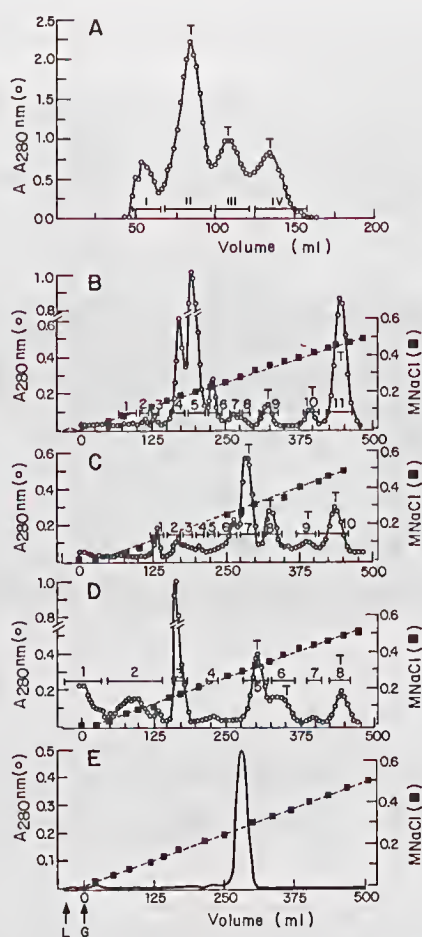



Fig.3. Chromatographic separation of *T. serrulatus* venom.
A: Sephadex G-50 gel filtration of 160 mg (in 1.4 ml) of soluble venom in 20 mM ammonium acetate buffer pH 4.7. Column of 0.9 x 200 cm run at flow rate of 15 ml/h and collected in 2 ml volume-fraction. Horizontal bars indicated pooled fractions (I-IV). T means toxic components. Final recovery was in the order of 83% as follows: fraction I (14%), II (32%), III (20%), IV (14.5%) and side tubes (2,5%).
B: CM-cellulose column separation of fraction II (approx. 42 mg) from Fig. 3A in the same buffer 20 mM ammonium acetate, pH 4.7, eluted with a linear gradient (250 ml each) from 0 to 0.55 M NaCl. Column (0.9 x 30 cm) was run at 30 ml/h, and tube-fractions of 2.5 ml were collected. Toxic fractions 9, 10 and 11 correspond respectively to 3.4, 2.4 and 24.1% of total protein recovered.
C: Same as in B for fraction III (26 mg) of Fig.3A Toxic fractions 8,9 and 10 correspond respectively to 15.5., 6.3 and 16.4% of protein recovered. Fractions 6 and 7 (toxic) were pooled because they were not well separated, and correspond to 32,4% of total material recovered.
D: Same as in B fraction IV (19 mg) of Fig.3A. Toxic fractions 5, 6 and 8 correspond respectively to 10.5, 5.9 and 4.9% of material recovered.
E: Final purification of gamma toxin from sub-fraction II-11 of Fig 3B (10 mg) in 50 mM phosphate buffer pH 6.0. Column, ion exchanger, flow rate, tube-fractions and salt gradient similar to Fig. 3B. Purified toxin is approximately 84% of the material applied to the column.

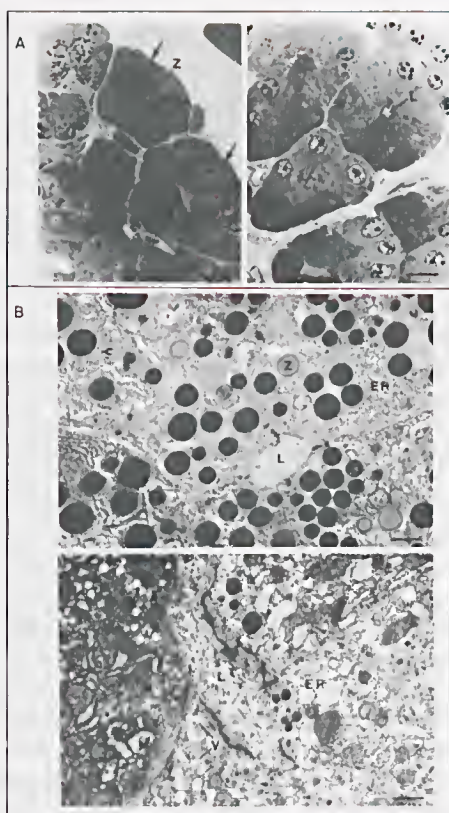



Fig.4. Light and electron micrographs of guinea pig pancreas.

Panel A: left panel (control): Light micrograph of normal guinea pig pancreas showing exocrine cells (arrows) arranged in alveolar units of acini around a central lumen (L). Densely stained zymogen granules (Z) are clustered in abundance around the apical portions of acinar cells. These cells characteristically have large numbers of zymogen granules prior to stimulation by cholinergic or peptidergic exocrine secretagogues. Another portion of the picture shows an Islet of Langerhans (IL). Bar igual 10μ.

Panel A: right panel (venom): Light micrograph of guinea pig pancreas after a lethal dose of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* whole venom. The animal died two hours postinjection. Zymogen granules are almost completely depleted due to their discharge from stimulation by the venom secretagogues. Bar igual 10μ.

Panel B: Upper panel (control): Electron micrograph of normal guinea pig pancreas 24 hours after a control injection of Krebs-Ringer Bicarbonate. Densely stained zymogen granules (Z) are packed at the apical portions of acinar cells prior to stimulation by natural secretagogues. The acinar lumen (L) is contracted with numerous microvilli and a small amount of secretory material characteristic of resting secretion. In general, both the Golgi complexes and the endoplasmic reticulum (ER) are normal in appearance. Bar igual 1μ

Panel B: Lower panel (venom): Electron micrograph of guinea pig pancreas from an animal injected with a lethal dose of venom from the Brazilian scorpion, *Tityus serrulatus*. At death, 2.8 hours post-injection, the zymogen granules had been discharged in response to stimulation by the venom secretagogues. The acinar lumen (L) is distended with densely stained crystalline secretory material. The two cells at right of picture have rough ER cisternae grossly dilated with secretory proteins and may have sustained some structural damage. Numerous apical vesicles (V) present in the cells at bottom and upper left are evidence that exocytosis had occurred. Bar igual 1μ

ins, and amino acid sequence. Table II summarizes the results of amino acid sequence determination of all the toxic components thus far analyzed. Also included for comparative purposes are data from the literature. It should be noted that toxin II-9A and II-9B were originally separated after reduction and alkylation of fraction II-9 (ref.[30]). Using a different strategy we were able to obtain toxin II-9A in homogeneous form to show the effect on K^+ channels [8] and Valdivia, H.H. and Possani, L.D., unpublished. Complete amino acid sequence of toxin gamma (II-11) was obtained after HPLC of enzymatically cleaved toxin[31]. Toxin III-8 sequence was also obtained after several cleavages of reduced and alkylated peptide, including carboxypeptidase time course hydrolysis[28].

Purified toxins have been used to verify the mechanism of action in a variety of preparations [41,18] and reviews[10,14,20]. As will be discussed below two classes of toxins were found in the venom of *T. serrulatus*, long chain polypeptides (approximately 60-62 amino acids), which impair functioning of Na^+ channels, and short-chain peptides (approximately 40 amino acid residues), which modify potassium channels from a variety of excitable membranes. Still another known effect of *T. serrulatus* venom is the secretagogue effect on pancreas[5,12,22,25]. For this reason the results of morphology experiments in guinea pigs reported in Fig. 4A (light microscope) and 4B (electron microscope) were performed. It is clearly shown in Fig. 4A (left picture for control) that zymogen granules in pancreatic acinar cells are abundant in the apical areas of these cells. The tissue displays its typical cytological organization, while in Fig. 4A (right picture for animals injected with venom) the zymogen granules are reduced in number or even absent in some acinar cells. Referring of the higher magnifications of the electron micrographs in Fig. 4B the acinar tissue demonstrates some of the distinctive characteristics of normal apical acinar cell organization with abundant electron-dense zymogen granules, compact acinar lumen with distinctive microvilli, and stacks of endoplasmic reticulum (ER) cisternae. In Fig. 4B (lower part, venom-treated pancreas) the apical region is largely devoid of mature zymogen granules, and a few granules of reduced size remain. The discharge of zymogen granules is evident from the abundance of crystalline and amorphous secretory content in this lumen. Fig. 4B shows in addition to the lack of zymogen granules that the ER cisternae are greatly distended with proteins vectorially destined for discharge. Apical vesicles are evidence of recycling of zymogen granule membrane after exocytotic release in response to venom-secretagogue stimulation. Other micrographs (not shown) demonstrate luminal surfaces partially effaced with loss of microvilli on part of the acinar plasmalemma.

The only enzymatic component isolated in homogeneous form from this venom was the hyaluronidase, which was non-toxic. For this purpose we have used three chromatographic separation steps (see Material and Methods). The enzyme activity is very stable in the whole venom, but during purification, especially in the last step, the activity is lost within a few hours.

The enzyme was obtained in pure form, as judged by polyacrylamide gel electrophoresis, and its molecular weight was calculated to be 42,000, with the aid of SDS polyacrylamide gels[19] (data not shown).

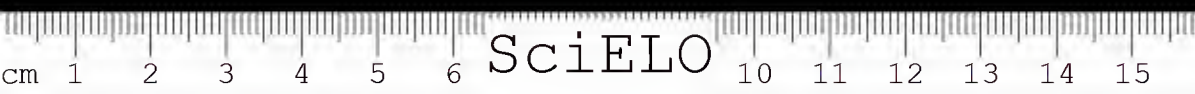
DISCUSSION

T. serrulatus venom from the Instituto Butantan (São Paulo, Brazil) used by our group during the last 18 years has always given very consistent biochemical and pharmacological results.

POSSANI, L.D. et al. Structural and functional characteristics of toxins purified from the venom of the Brazilian scorpion **Tityus serrulatus** Lutz and Mello. **Mem. Inst. Butantan**, v. 54, n. 2, p. 35-52, 1992.

Numerous batches of venom obtained from the Butantan Institute during the period of 1973 to 1990 have been used in our laboratories, initially for purification of several toxins[2] and characterization of gamma toxin[27,13]. Since 1981 the strategy we have followed for purification and chemical characterization of toxins is very similar to the one presently described[29,31], which we assume is the most convenient one. At least in our hands the venom from the Butantan Institute is highly appreciated because of its constant and reproducible biochemical and pharmacological behavior. One of the main objectives of this communication is to compare venom obtained from *T. serrulatus* scorpion of different geographical localities of Brazil; at least from regions not considered to be ''restricted areas'', as mentioned by other authors[10,34]. A careful observation of our results (Fig. 1 to 3) indicates that there are no significant differences in the venom of *T. serrulatus* collected in topological areas greater than 400 Km. The distance of Santa Barbara, Corrego Novo and Cataguazes from Belo Horizonte, the capital of the State of Minas Gerais, is 100, 400 and 460 Km respectively, while the distance of Aparecida do Norte from the capital of São Paulo State is 200 Km. Lethality tests conducted with venom from scorpions of different localities, using 10 different doses of venom, in 10 different groups of mice (strain CD1, i.p.) gave essentially the same value (see Results), which in turn is the same or very similar to the value initially reported by Bücherl[7], and by our group[27], of 25 μg/20 g mouse weight. Electrophoretic separation of venoms by the system of Reisfeld *et al*[33], suggested also that there was no appreciable difference in these venoms. It is worth mentioning that Reisfeld's method is capable of discriminating small differences (charge groups) in scorpion toxins. If sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis is used according to the technique of Laemmli[19], most of the toxins comigrate in a single broad band. Thus, we conclude that the beta-alanine-acetate-urea gel system is better suited for verification of scorpion toxin purity, and is a good criterion for judging homogeneity of sample. Futhermore, immunoelectrophoresis is an adequate technique for verification of heterogeneity of samples; at least, it can discriminate mixtures of antigens or possible immunodominant antigens. This was the case found (Fig. 2B) when comparing venom from another related species of scorpion *(Tityus discrepans)* collected in Venezuela. Finally, the chromatographic separation by Sephadex G-50 and CM-Cellulose shows that these venoms are very similar in composition (data not shown).

The separation procedure described here for the isolation of mammalian toxins from the venom of *T. serrulatus* allows the identification of 10 sub-fractions toxic to mice. However, fraction II-11 (originally denominated toxin gamma[27] and III-10 are identical components, as demonstrated by amino acid analysis (Table I) and by amino acid sequence (Table II).

Fractions II and III from Sephadex G50 column (Fig. 3A) are not well separated, hence the subsequent ion exchange chromatography of both fractions in CM-Cellulose columns at pH 4.7 (Fig. 3B and 3C) provided two chromatographic peaks corresponding to the same toxin. The major toxic components in the venom of *T. serrulatus* are toxin gamma, III-8 and IV-5. They have in the order of 60-62 amino acid residues (Table I), with a calculated molecular weight of 6,500 to 7,000. Toxic sub-fraction III-7 is also a major component of the venom, but it is heavily contaminated (data not shown), and still further purification is required. Among the minor components are toxins II-9, II-10, III-9, IV-6 and IV-8. Toxin II-10 has an amino acid sequence identical to toxin gamma up to residue 46 (Table II), already sequenced. Similarly, component II-9B is equivalent to III-8 up to residue 30 (Table II). Chemical differences between these two pairs of components possibly are at the C-terminal region of the molecule.

Minor components III-9 and IV-8 were not studied, and component IV-6 is identical to IV-5 up to residue number 30 (Table II). Moreover, the difference in chromatographic behaviour may be due to a deamination occuring at an Asn (or Gln). Component II-9A is a minor component, initially found by direct sequence[30], with sequence homology to Noxiustoxin, a K^+ channel blocking peptide isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom[9]. Rechromatography of component II-9, produced toxin 1, which blocks K^+ channels of squid giant axons[8].

Other authors have studied venom from *T. serrulatus* and found similar toxins named with different nomenclature as the one we have proposed. The first toxin purified was Tityustoxin by the group of Prof. Diniz[15] in Brazil. This toxin is similar in amino acid composition to our component IV-5 (see review[10]). The purification procedure of Toledo and Neves[37] confirms the presence of more than one toxin in the venom of *T. serrulatus*, but presented no amino acid sequence data. Based on amino acid composition and N-terminal amino acid (lysine) we have surmised that toxin TsTx-I[37] is the toxin gamma of our work, while toxin TsTx-II is a new toxin in this venom[37]. It does not correspond with any of the toxins we are describing or to the ones purified by Sampaio *et al.*[35].

The group of Prof. Rochat in France has sequenced a toxin[6] almost identical to gamma toxin[31], which they have called toxin VII. The only difference is at the cysteine at position 61, which they report to be amidated. The publication by Sampaio *et al*[36] reports the purification of five toxins from *T. serrulatus*. Considering the amino acid sequence reported[35], toxin T1VIII is similar to toxin gamma[27], toxin T2III1 is possibly the same as IV-5 of our work. Toxins T1VI and T1IV[35] seem to be toxins previously unreported in this venom.

Concerning the pharmacological effects of venom or purified toxins from *T. serrulatus*, the reviews by Diniz[10] and recently by Freire-Maia and Campos[14] summarize the main results. It is clear that most of the action of the toxic peptides is through impairment of ion channel (sodium and potassium) funcion. Among the most significant works thus far published are the effects of gamma toxin and Tityustoxin on neuroblastoma cells (NIE 115), rat brain synaptosome membranes, chick heart sarcolemma and other membrane preparations (see review by Lazdunski *et al.*[20]). Our group was able to show that gamma toxin affects the peak permeabillyty of Na^+ in cardiac cells, like the beta scorpion toxins[41], while toxin IV-5 modifies Na^+ channel gating like the North African alpha scorpion toxins[18]. Squid giant axon potassium channels are blocked by toxin II-9A (toxin 1) of *T. serrulatus* venom[8]. Experimental pancreatitis in dogs caused by *T. serrulatus* was reported by Machado *et al.*[22], and *T. trinitatis* induced pancreatitis in humans by Bartholomew[5]. Pioneer work with purified scorpion toxin from *T. serrulatus* (tityustoxin) on the pancreatic secretion of the rat was published by Novaes *et al.*[25].

We have demonstrated the effects of whole venom from *T. serrulatus* and purified peptides (III-8, III-10, and IV-5) in rodents (mouse, rat and guinea pig) *in vitro* and *in vivo*[12]. Morphological alterations due to secretagogue effects of whole venom (Fig 4) and its peptide components are apparent by both light and electron microscopy of pancreatic acinar cells. Biochemical measurements of pancreatic secretion were carried out by both radioisotopic pulse-chase experiments as well as determinations of enzymatic activity discharged[12]. These studies indicate that the venom from *T. serrulatus* causes extensive discharge of secretory proteins *in vivo* and *in vitro*.

Humans stung by scorpions of genera *Tityus* and *Centruroides* in North and South America develop potentially lethal symptoms from action of the venom on

peripheral nerves and vital organs[10,14,20,25,41]. Included in a myriad of distress factors is the epigastric pain of acute pancreatitis[5,12,22,25,28]. This pain is accompanied be elevated serum amylase associated with clinical signs of acute pancreatitis[12,25,28]. There are occasions when the pancreatitis alone is severely debilitating and represents a complication that can extend the recovery of these patients considerably. When the individuals are not treated promptly with appropriate antiserum the clinical course is always aggravated and prolonged, particularly in children under age 5[12,22].

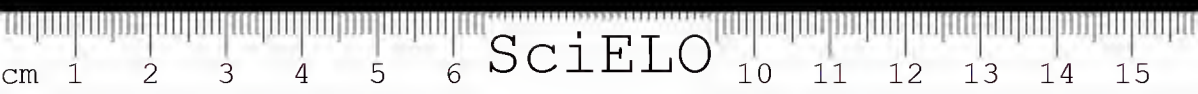
The only non toxic protein isolated from *T. serrulatus* venom, in pure form, is the enzyme hyaluronidase that we have described here. This enzyme is known to be ubiquitous in most scorpion venoms[1,27,39], and was initially reported to be present also in *T. serrulatus* venom[27].

The enzyme is of high molecular weight (approx. 42,000) and is likely to be a glycoprotein, since it binds concanavalin A. We have originally described a similar enzyme in the venom of *Centruroides limpidus limpidus*[1].

CONCLUSIONS

1. Venom from the scorpion *T. serrulatus* collected in several distinct geographical localities of Brazil does not show detectable differences in biochemical and pharmacological properties.
2. The venom from Butantan Institute, in our hands, has proved to provide reproducible results over a period of 18 years.
3. The venom contains two classes of mammalian peptide toxins, long-chain neurotoxins with 60 to 62 amino acid residues, which block sodium channel of excitable membranes (variety of tissues and sources), and short chain neurotoxins (approx. 40 amino acids) which block potassium permeability (squid giant axons and rabbit skeletal muscle).
4. The diversity of toxic peptides in the venom of *T. serrulatus* venom confirms similar finding with *Centruroides* species of the North American continent, and *Androctonus, Leiurus* and *Buthus* species of Africa and Asia.
5. We confirm data of a potent secretory effect of venom from *T. serrulatus* in pancreas.

RESUMO: O veneno de escorpiões *Tityus serrulatus* coletados em quatro localidades geográficas distintas do Brasil foi estudado por eletroforese em gel, imunoeletroforese, filtração em Sephadex G-50 e cromatografia de intercâmbio iônico. Também se conduziram experiências de letalidade em camundongos. Nenhum destes métodos revelou diferenças significativas entre as amostras de veneno. O veneno de *T. serrulatus* do Instituto Butantan tem demonstrado propriedades bioquímicas e farmacológicas constantes e reproduzíveis em nossos laboratórios por cerca de 18 anos. O veneno possui vários polipeptídeos tóxicos ao camundongo. Entre os componentes tóxicos que aparecem em maior concentração no veneno estão toxina gama, III-8 e IV-5, as quais modificam a permeabilidade de sódio em canais iônicos. O peso molecular destas toxinas é da ordem de 7,000. Um dos componentes que aparecem em menor concentração no veneno é a toxina II-9A, um pequeno peptídeo (aproximadamente de 4,200 de peso molecular) que modifica a permeabilidade do potássio em axons. Pelo menos outros 4 componentes que aparecem em baixa quantidade no veneno também foram purificados com seqüência de aminoácidos muito semelhantes aos com-

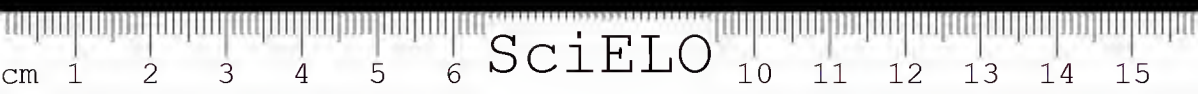
ponentes gama, III-8 e IV-5. O veneno de *Tityus serrulatus* exerce um efeito secretagôgo importante em pâncreas de cobaias.

UNITERMOS: Toxinas de escorpião, *Tityus serrulatus*, pancreatite, seqüência de aminoácidos.

ACKNOWLEDGEMENTS

Dr. Jorge Villegas is acknowledged for providing facilities for two of us (L.D.P. and P.L.F.) during collection of scorpions *Tityus discrepans* of Caracas (Venezuela); and Prof. M.A. Gonzalez-Sponga for identification of the species collected. Technical assistance of Mr. Pedro Sauceda Ramirez and Mercedes Sifuentes Valenzuela during preparation of the art work is recognized.

REFERENCES

1. ALAGON, A.C., POSSANI, L.D. Utilizacion de cromatografia por afinidad para la purificacion de enzimas de venenos animales. In: HUITRON, C., ed. *Biotecnologia de enzimas*. México: UNAM, 1983. p. 125-135.
2. ALAGON, A.C., POSSANI, L.D., ERICKSON, B.W. Isolation and characterization of several proteins from *Tityus serrulatus* scorpion venom. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL PLANT AND MICROBIAL TOXINS, 5, 1976, San José, Costa Rica. *Abstracts*... p. 35.
3. ALAGON, A.C., POSSANI, L.D., ERICKSON, B.W. Isolation and characterization of several proteins from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, Suppl. 1, p. 609-618, 1978.
4. AXELSEN, N.H., CLAESSON, M.H., HARDT, F., RANLOV, P., ROPKE, C. A low-dose immunization schedule for the production of ALG in rabbits. *Scand. J. Immunol, v.1*, p. 109-113, 1972.
5. BARTHOLOMEW, C. Acute scorpion pancreatitis in Trinidad. *Br. Med. J., v.1*, p. 666-668, 1970.
6. BECHIS, G., SAMPIERI, F., YUAN, P.M., BRANDO, T., MARTIN, M.F., DINIZ, C.R., ROCHAT, H. Amino acid sequence of toxin VII, a beta-toxin from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus. Biochem. Biophys. Res. Commun., v.122*, p. 1.146-1.153, 1984.
7. BÜCHERL, W. Classification, biology, and venom extraction of scorpions. In: BÜCHERL, W., BUCKLEY, E.E., ed. *Venomous animals and their venoms, III. Venomous vertebrates*. New York: Academic Press, 1971. p. 317-147.
8. CARBONE, E., PRESTIPINO, G., WANKE, E., POSSANI, L.D., MAELICKE, A. Selective action of scorpion neurotoxins on the ionic currents of the squid giant axon. *Toxicon*, Suppl. 3, p. 57-60, 1983.
9. CARBONE, E., WANKE, E.; PRESTIPINO, G., POSSANI, L.D., MAELICKE, A. Selective blockage of voltage-dependent K^+ channels by a novel scorpion toxin. *Nature, v. 296*, p. 90-91, 1982.
10. DINIZ, C.R. Chemical and pharmacologic aspects of Tityinae venoms. In: BETTINI, S., ed. *Arthropod venoms*. Berlim: Springer-Verlag, 1978. p.379-394.
11. EDMAN, P., BEGG, G. A protein sequenator. *Eur. J. Biochem., v. 1*, p. 80-91, 1967.
12. FLETCHER, M.D., FLETCHER JR., P.L. Biochemical and ultrastructural changes associated with scorpion venom induced pancreatitis. *Digestive Dis., v. 29*, p. A10, 1984.

13. FLETCHER JR., P.L., POSSANI, L.D., ALAGON, A.C. Amino terminal sequence of the gamma-neurotoxin isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL PLANT AND MICROBIAL TOXINS, 5, 1976, San José, Costa Rica. *Abstracts...* p. 46.
14. FREIRE-MAIA, L., CAMPOS, J.A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In: OWNBY, C.L., ODELL, G.V., ed. *Natural toxins*. Oxford: Pergamon Press, 1989. p. 139-159.
15. GOMEZ, M.V., DINIZ, C.R. Separation of toxic components from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. *Mem. Inst. Butantan, v. 33*, p. 899-902, 1966.
16. KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol, v. 27*, p. 137A, 1965.
17. KING, T.P., ALAGON, A.C., KWAN, J., SOBOTKA, A.K., LICHTEINSTEIN, L.M. Immunochemical studies of yellow-jacket venom proteins. *Mol. Immunol, v. 20*, p. 297-308, 1978.
18. KIRSCH, G.E., SKATTEVOL, A., POSSANI, L.D., BROWN, A.M. Modification of Na channel gating by an alpha scorpion toxin from *T. serrulatus. J. Gen. Physiol., v. 93*, p. 67-83, 1989.
19. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, v. 227*, p. 680-685, 1970.
20. LAZDUNSKI, M., FRELIN, C., BARHANIN, J., LOMBET, A., MEIRI, H., PAURON, D., ROMEY, G., SCHMID, A., SCHWEITZ, H., VIGNE, P., VIJVERBERG, H.P.M. Polypeptide toxins as tools to study voltage-sensitive Na^+ channels. In: KAO, C.Y., LEVINSON, S.R., ed. *Tetrodotoxin Saxitoxin and the Molecular Biology of the Sodium Channel.* (Annals N. York Acad. Sci., 479, 1986, p. 204-220).
21. LUFT, J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol., v. 9*, p. 409-414, 1961.
22. MACHADO, J.C., SILVEIRA Fº, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. *Mem. Inst. Butantan, v. 40/41*, p. 1-9, 1976/77.
23. MARTIN, B.M., CARBONE, E., YATANI, A., BROWN, A.M., RAMIREZ, A.N., GURROLA, G.B., POSSANI, L.D. Amino acid sequence and physiological characterization of toxins from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxicon, v. 26*, p. 785-794, 1988.
24. MOORE, S. On the determination of cystine as cysteic acid. *J. Biol. Chem., v. 238*, p. 235-237, 1963.
25. NOVAES, G., CATANZARO, D.L., BERALDO, W.T., FREIRE-MAIA, L. Effect of purified scorpion toxin (tityustoxin) on the pancreatic secretion of the rat. *Toxicon, v. 20*, p. 847-853, 1982.
26. POSSANI, L.D. Structure of scorpion toxins. In: TU, A.T., ed. *Handbook of natural toxins*. New York: Marcel Dekker, 1984. v.2, p. 513-550.
27. POSSANI, L.D., ALAGON, A.C., FLETCHER JR., P.L., ERICKSON, B.W. Purification and properties of mammalian toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Arch. Biochem. Biophys., v.180*, p. 394-403, 1977.
28. POSSANI, L.D., MARTIN, B.M., FLETCHER, M.D., FLETCHER JR, P.L. Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produced by toxins purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *J. Biol. Chem., v. 266*, p. 3.178-3.185, 1991.
29. POSSANI, L.D., MARTIN, B.M., MOCHCA-MORALES, J., SVENDSEN, I. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom

of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Carlsberg Res. Commun., v. 46*, p. 195-205, 1981.
30. POSSANI, L.D;, MARTIN, B.M., SVENDSEN, I. The primary structure of Noxiustoxin: a K^+channel blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res. Commun., v.47*, p. 285-289, 1982.
31. POSSANI, L.D., MARTIN, B.M., SVENDSEN, I., RODE, G.S., ERICKSON, B.W. Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus. Biochem. J., v.229*, p. 739-750, 1985.
32. RAMIREZ, A.N., GURROLA, G.B., MARTIN, B.M., POSSANI, L.D. Isolation of several toxins from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxicon, v.26*, p. 773-783, 1988.
33. REISFELD, R.A., LEWIS, U.J., WILLIAMS, D.E. Disck electrophoresis of basic proteins on polyacrylamide gels. *Nature, v.195*, p. 281-283, 1962.
34. ROCHAT, H., BERNARD, P., COURAUD, F. Scorpion toxins: chemistry and mode of action. In: CECCARELLI, B., CLEMENTI, F., ed. *Advances in cytopharmacology.* New York: Raven, 1979. v.3. p. 325-334.
35. SAMPAIO, S.V., LAURE, C.J., GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus. Toxicon, v.21*, p. 265-277, 1983.
36. SCHEELE, G.A., PALADE, G.E. Studies on the guinea pig pancreas. *J. Biol. Chem., v.250*, p. 2.660-2.670, 1975.
37. TOLEDO, D., NEVES, A.G.A. Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus. Comp. Biochem. Physiol., v.55B*, p. 249-253, 1976.
38. TOLKSDORF, S., McCREADY, M.H., McCULLAGH, D.R., SCHWENK, E. The turbidimetric assay of hyaluronidase. *J. Lab. Clin. Med., v.34*, p. 74-89, 1949.
39. TU, A.T. Scorpion venoms. In: TU, A.T., ed. *Venoms: chemistry and molecular biology.* New York: John Wiley, 1977. p. 459-483.
40. VENABLE, J.H., COGGESHALL, R. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol., v. 25*, p. 407-408, 1965.
41. YATANI, A., KIRSCH, G.E., POSSANI, L.D., BROWN, A.M. Effects of New World scorpion toxins on single-channel and whole cell cardiac sodium currents. *Amer. J. Physiol., v. 254* (Heart Circ. Physiol. 23), p. H443-H451, 1988.

POSSANI, L.D. et al. Structural and functional characteristics of toxins purified from the venom of the Brazilian scorpion **Tityus serrulatus** Lutz and Mello. **Mem. Inst. Butantan**, v. **54**, n. 2, p. 35-52, 1992.

TABLE 1
Amino Acid Composition of Toxins from the Venom of *Tityus serrulatus**

Toxin	II-11	III-10	III-8	IV-5
Amino Acid	Residues per Mole	Residues per Mole	Residues per Mole	Residues per Mole
ASP	3.7 (4)	3.8 (4)	4.9 (5)	9.5 (10)
THR	0.9 (1)	1.1 (1)	1.9 (2)	1.9 (2)
SER	3.8 (4)	3.9 (4)	2.8 (3)	2.8 (3)
GLU	3.1 (3)	3.3 (3)	2.2 (2)	2.0 (2)
PRO	3.0 (3)	2.8 (3)	2.8 (3)	2.8 (3)
GLY	8.0 (8)	8.0 (8)	6.0 (6)	4.0 (4)
ALA	3.0 (3)	3.0 (3)	5.6 (6)	2.9 (3)
1/2CYS	8.0 (8)	6.3 (6-8)	6.5 (6-8)	7.0 (6-8)
VAL	1.8 (2)	2.0 (2)	1.9 (2)	1.8 (2)
MET	0.9 (1)	0.9 (1)	0.9 (1)	0.0 (0)
ILE	1.9 (2)	2.0 (2)	1.8 (2)	1.8 (2)
LEU	3.0 (3)	3.1 (3)	1.3 (1)	3.0 (3)
TYR	4.5 (5)	4.7 (5)	5.3 (5)	7.7(8)
PHE	1.0 (1)	1.1 (1)	2.9 (30)	0.0 (0)
HIS	1.0 (1)	1.0 (1)	2.7 (3)	1.0 (1)
LYS	5.5 (5)	6.2 (6)	6.9 (7)	6.7 (7)
ARG	2.6 (3)	2.8 (3)	1.0 (1)	0.0 (0)
TRP	3.0 (3)	3.0 (3)	2.0 (2)	2.0 (2)
Residues	61	61	62	60
Mol. Wt.	6686	6686	6957	6918

*Taken from Possani *et al.*[28]

POSSANI, L.D. et al. Structural and functional characteristics of toxins purified from the venom of the Brazilian scorpion **Tityus serrulatus** Lutz and Mello. **Mem. Inst. Butantan**, v. **54**, n. 2, p. 35-52, 1992.

TABLE 2
AMINO ACID SEQUENCRE OF T. serrulatus SCORPION TOXINS

TOXIN	AMINO ACID SEQUENCE	REFERENCE
T.s. (II-11)	KEGYLMDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKC	31
T.s. III-10	KEGYLMDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKC	31
T.s. II-10	KEGYMDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYG...	26
T.s. III-8	KEGYAMDHEGCKFSCFIRPAGFCDGYCKTHLKASSGYCAWPACYCYGVPDHIKVWDYATNKC	28
T.s. IV-5	KKDGYPVEYDNACYICWNYDNAYCDKLCKDKKADSGYCYWV...	26
T.s. IV-6	KKDGYPVEYDNACYICWNYD...	26
T.s. II-9A	VFINAKCRGSPECLPKCKEAXGKAAGKCXN...	30
T.s. II-9B	KEGYAMDHEGCKFSCFIRPAGFCDGYCKTH...	26
T_1 VIII	KZGYLMBHZGCK...	35
T_1 III_1	KKBGYPVCCS...	35
T_1 IV	KZGYXL...	35
T_1 V_1	GHFGK...	35

Mem. Inst. Butantan
v. 54, n. 2, p. 53-59, 1992

HERPETOFAUNA DAS DUNAS INTERIORES DO RIO SÃO FRANCISCO: BAHIA: BRASIL. V. DUAS NOVAS ESPÉCIES DE *APOSTOLEPIS* (OPHIDIA, COLUBRIDAE)

Miguel Trefaut RODRIGUES

RESUMO: São descritas duas novas espécies de colubrídeos do gênero *Apostolepis* obtidas na região de dunas paleoquaternárias do rio médio São Francisco. *Apostolepis arenarius* é caracterizado pelo número mais baixo de ventrais até então conhecido para o gênero. *Apostolepis gaboi* é diagnosticado pelo padrão de sete faixas longitudinais, pelo número de escamas ventrais e subcaudais e pela escutelação cefálica.

UNITERMOS: Taxonomia, Reptilia, Colubridae, *Apostolepis*

INTRODUÇÃO

As dunas paleoquaternárias do médio rio São Francisco encontram-se no noroeste do Estado da Bahia, encravadas em uma extensa área dominada por caatingas típicas. Os trabalhos de campo conduzidos na região têm mostrado que a fauna de répteis local é variada e distinta da das caatingas que a circundam. Até o momento 29 espécies de lagartos e 6 de anfisbenídeos são conhecidas da área, sendo 20 espécies de répteis supostamente endêmicas dali, muitas delas caracterizadas por adaptações ao habitat psamófilo. As publicações anteriores sobre a fauna da área trataram da descrição de novos gêneros e espécies de lagartos (Rodrigues, 5,6,7), cobras (Rodrigues, 8) e anfisbenídeos (Vanzolini, 10,11). Uma descrição detalhada do habitat e do contexto ecológico e evolutivo em que o trabalho se insere pode ser encontrada em Rodrigues (5). Descrevo aqui duas novas espécies do gênero *Apostolepis* obtidas na região. A primeira delas, em função do seu modo de vida passo a tratar por

---

Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia, Caixa Postal 20.520, 01498-970 — São Paulo, SP.

Recebido para publicação em 03.02.92 e aceito em 06.07.92.

RODRIGUES, M.T. Herpetofauna das dunas interiores do Rio São Francisco: Bahia. Brasil. V. Duas novas espécies de **Apostolepis** (Ophidia, Colubridae). **Mem. Inst. Butantan**, v. **54**, n. 2, p. 53-59, 1992.

Apostolepis arenarius, sp. n.
(Figuras 1 e 2)

Holótipo: MZUSP 10.027, fêmea, Brasil: Bahia: Alagoado (9° 29'S, 41° 21' N) 5.ix.88, MRodrigues, número de campo 88.6819

Parátipos: MZUSP 10.028-10.030, demais dados como para o holótipo, MZUSP 10.289 Alagoado, Ba., 20 x 90.

Diagnose

Colorido de fundo vermelho tijolo com cinco faixas longitudinais estreitas castanho-escuras. Quinta e sexta supralabiais em contato com a parietal. Ventrais 168-181; 24 a 31 pares de subcaudais.

Descrição

Rostral visível de cima e quase tão longa quanto larga, subtriangular, com vértice voltado para trás e separando as nasais. Nasal inteira, separada da preocular, mais longa do que alta e mais estreita posteriormente, inserida entre a primeira e a segunda supralabiais, a prefrontal e a rostral. Narina na metade posterior da nasal. Loreal e internasais ausentes.

Prefrontais grandes, maiores que a frontal, quase tão longas quanto largas, em amplo contato mediano e em contato com as supralabiais. Supraocular menor que a frontal e sobre o olho. Uma pré e uma postocular quase quadrangulares e um pouco maiores que o olho. Frontal mais longa do que larga, indentando a sutura posterior das prefrontais. Parietais muito longas, cerca de duas vezes mais longas que a frontal e em contato com as supralabiais posteriores, com uma escama ligeiramente maior que as dorsais, a postocular, a supraocular e a frontal. Seis supralabiais, quinta e sexta maiores, a terceira sob o olho; quinta e sexta em contato com a parietal, eventualmente a quarta. Temporais ausentes fusionadas à quinta e sexta supralabiais.

Fig. 1. *Apostolepis arenarius*

RODRIGUES, M.T. Herpetofauna das dunas interiores do Rio São Francisco: Bahia. Brasil. V. Duas novas espécies de Apostolepis (Ophidia, Colubridae). Mem. Inst. Butantan, v. 54, n. 2, p. 53-59, 1992.

Sinfisal pequena, triangular, um pouco mais longa que larga. Sete a oito infralabiais, o primeiro par em contato atrás da sinfisal. Dois pares de mentais seguindo o contato posterior do primeiro par de infralabiais. O primeiro em contato com as quatro primeiras infralabiais, o segundo apenas com a quinta e sexta.

Dorsais lisas, dispostas em 15 fileiras longitudinais sem redução. Fossetas apicais ausentes. Ventrais largas, 168 a 181; 24 a 31 pares de subcaudais. Anal dividida.

Porção dorsal da cabeça predominantemente negra. Frontal, prefrontal e escudos anteriores em sua maioria amarelos com algumas manchas negras irregulares. Primeira supralabial manchada de amarelo. Uma faixa estreita amarela pouco após o olho ocupa parte da terceira e quarta supralabiais. Porção ventral da cabeça predominantemente amarela com manchas escuras difusas e irregulares sobre as infralabiais.

Fig. 2: *Apostolepis arenarius*

Um colar amarelo nítido logo após a cabeça ocupa a largura de cinco escamas, e é seguido por uma faixa negra transversal que ocupa apenas a região mediodorsal e tem 2 a 3 escamas de largura. Deste último partem três linhas negras longitudinais. A primeira corre ao longo da fileira vertebral, as outras duas na sexta fileira de dorsais. Abaixo destas, e de cada lado do corpo na altura da 41 fileira de dorsais está presente uma linha negra muito mais estreita que se estende como as demais até a ponta da cauda. Ápice da cauda caracteristicamente negro, ventre branco uniforme.

Comprimento do corpo e da cauda (mm), respectivamente: Holótipo: 295+28; Parátipos: 151+17, 172+24 e 145+14. Diâmetro do corpo do holótipo e parátipos respectivamente 5,8mm, 4,6mm, 4,4mm, 3,8mm e 5,9mm.

A segunda espécie apresenta corpo muito mais delgado e também foi encontrada na areia. Ela é descrita abaixo em homenagem a Gabriel Skuk que coletou o único exemplar e prestou valiosa ajuda no campo.

Sinfisal pequena, triangular, um pouco mais longa que larga. Sete a oito infralabiais, o primeiro par em contato atrás da sinfisal. Dois pares de mentais seguindo o contato posterior do primeiro par de infralabiais. O primeiro em contato com as quatro primeiras infralabiais, o segundo apenas com a quinta e sexta.

Dorsais lisas, dispostas em 15 fileiras longitudinais sem redução. Fossetas apicais ausentes. Ventrais largas, 168 a 181; 24 a 31 pares de subcaudais. Anal dividida.

Porção dorsal da cabeça predominantemente negra. Frontal, prefrontal e escudos anteriores em sua maioria amarelos com algumas manchas negras irregulares. Primeira supralabial manchada de amarelo. Uma faixa estreita amarela pouco após o olho ocupa parte da terceira e quarta supralabiais. Porção ventral da cabeça predominantemente amarela com manchas escuras difusas e irregulares sobre as infralabiais.

Fig. 2: *Apostolepis arenarius*

Um colar amarelo nítido logo após a cabeça ocupa a largura de cinco escamas, e é seguido por uma faixa negra transversal que ocupa apenas a região mediodorsal e tem 2 a 3 escamas de largura. Deste último partem três linhas negras longitudinais. A primeira corre ao longo da fileira vertebral, as outras duas na sexta fileira de dorsais. Abaixo destas, e de cada lado do corpo na altura da 41 fileira de dorsais está presente uma linha negra muito mais estreita que se estende como as demais até a ponta da cauda. Ápice da cauda caracteristicamente negro, ventre branco uniforme.

Comprimento do corpo e da cauda (mm), respectivamente: Holótipo: 295+28; Parátipos: 151+17, 172+24 e 145+14. Diâmetro do corpo do holótipo e parátipos respectivamente 5,8mm, 4,6mm, 4,4mm, 3,8mm e 5,9mm.

A segunda espécie apresenta corpo muito mais delgado e também foi encontrada na areia. Ela é descrita abaixo em homenagem a Gabriel Skuk que coletou o único exemplar e prestou valiosa ajuda no campo.

RODRIGUES, M.T. Herpetofauna das dunas interiores do Rio São Francisco: Bahia. Brasil. V. Duas novas espécies de **Apostolepis** (Ophidia, Colubridae). **Mem. Inst. Butantan**, v. **54**, n. 2, p. 53-59, 1992.

Apostolepis gaboi, sp. n.
(Figura 3)

Holótipo: MZUSP 10.290, fêmea, Brasil: Bahia: Queimadas (10° 23'S, 42°30W), 12/x/90, Gabriel Skuk col. MRodrigues 907198.

Diagnose

Colorido dorsal ferrugem com 7 finas linhas longitudinais ao longo do corpo. Quinta e sexta supralabiais em contato com a parietal. Nasal separada da preocular., Ventrais 229; 31 pares de subcaudais.

Fig. 3: *Apostolepis gaboi*

Descrição

Rostral bem visível de cima, quase tão longa quanto larga, com vértice voltado para trás e separando amplamente as nasais. Nasal inteira, separada da preocular; mais longa do que alta e mais estreita posteriormente; inserida entre a primeira e a segunda supralabiais, a prefrontal e a rostral. Narina na metade da escama. Loreal e internasais ausentes. Prefrontais grandes, mais curtas que a frontal, quase tão longas quanto largas e em amplo contato mediano, em contato com a segunda supralabial. Frontal ligeiramente mais longa do que larga, ultrapassando pouco o nível da margem anterior das supra-oculares e indentando ligeiramente a sutura com as prefrontais. Supra-oculares menores que a frontal com sua margem posterior retilínea. Uma pré e uma postocular, a primeira muito pequena, a segunda maior, em contato com a supra-ocular e com o tamanho aproximado do olho. Parietais muito longas, cerca de duas vezes mais longas que a frontal e em contato com a quinta e sexta supralabiais, com uma escama ligeiramente maior que as dorsais, com a frontal, a supra-ocular e a postocular. Seis supralabiais, a quinta e sexta maiores; a segunda e terceira atingem a órbita sendo que a última está sob o olho. Temporais ausentes, respectivamente fusionadas à quinta e sexta supralabiais.

RODRIGUES, M.T. Herpetofauna das dunas interiores do Rio São Francisco: Bahia. Brasil. V. Duas novas espécies de **Apostolepis** (Ophidia, Colubridae). **Mem. Inst. Butantan**, v. **54**, n. 2, p. 53-59, 1992.

Apostolepis gaboi, sp. n.
(Figura 3)

Holótipo: MZUSP 10.290, fêmea, Brasil: Bahia: Queimadas (10° 23'S, 42°30W), 12/x/90, Gabriel Skuk col. MRodrigues 907198.

Diagnose

Colorido dorsal ferrugem com 7 finas linhas longitudinais ao longo do corpo. Quinta e sexta supralabiais em contato com a parietal. Nasal separada da preocular. Ventrais 229; 31 pares de subcaudais.

Fig. 3: *Apostolepis gaboi*

Descrição

Rostral bem visível de cima, quase tão longa quanto larga, com vértice voltado para trás e separando amplamente as nasais. Nasal inteira, separada da preocular; mais longa do que alta e mais estreita posteriormente; inserida entre a primeira e a segunda supralabiais, a prefrontal e a rostral. Narina na metade da escama. Loreal e internasais ausentes. Prefrontais grandes, mais curtas que a frontal, quase tão longas quanto largas e em amplo contato mediano, em contato com a segunda supralabial. Frontal ligeiramente mais longa do que larga, ultrapassando pouco o nível da margem anterior das supra-oculares e indentando ligeiramente a sutura com as prefrontais. Supra-oculares menores que a frontal com sua margem posterior retilínea. Uma pré e uma postocular, a primeira muito pequena, a segunda maior, em contato com a supra-ocular e com o tamanho aproximado do olho. Parietais muito longas, cerca de duas vezes mais longas que a frontal e em contato com a quinta e sexta supralabiais, com uma escama ligeiramente maior que as dorsais, com a frontal, a supra-ocular e a postocular. Seis supralabiais, a quinta e sexta maiores; a segunda e terceira atingem a órbita sendo que a última está sob o olho. Temporais ausentes, respectivamente fusionadas à quinta e sexta supralabiais.

Sinfisal pequena, triangular, um pouco mais longa do que larga. Oito infralabiais, o primeiro par em contato atrás da sinfisal. Dois pares de mentais, o primeiro atinge as primeiras quatro infralabiais, o segundo apenas a quarta e a quinta.

Dorsais lisas, dispostas em 15 fileiras longitudinais sem redução. Fossetas apicais ausentes. Ventrais largas, dispostas em 229 fileiras; 31 pares de subcaudais. Anal dividida.

Porção dorsal posterior da cabeça predominantemente castanho-escuro com manchas amarelas irregulares e conspícuas sob as labiais. Porção anterior da cabeça amarela. Parte ventral da cabeça amarela com manchas escuras mais concentradas posteriormente.

Um colar amarelo nítido com 3 escamas de comprimento segue-se após a cabeça e é delimitado posteriormente por uma faixa negra transversal com duas escamas de largura. Desta faixa negra partem cinco estrias longitudinais dorsais com a mesma largura que ocupam a parte central das fileiras de escamas que ornamentam: uma mediodorsal e duas outras de cada lado do dorso respectivamente sobre a quarta e a sexta fileiras dorsais. Abaixo destas, uma linha negra interrompida, muito mais estreita e inconspícua corre ao nível da terceira fileira de escamas dorsais. As demais estendem-se até a ponta da cauda. Ápice da cauda caracteristicamente negro. Ventre creme, imaculado. Comprimento do corpo: 218mm; comprimento da cauda: 20 mm. Diâmetro do corpo: 2,8 mm.

DISCUSSÃO

A sistemática de *Apostolepis* é complexa. O número de escamas ventrais e subcaudais que são úteis na diagnose de espécies de outros gêneros é, com poucas exceções, de pouca ajuda para separar as espécies deste gênero. Isto se deve à ampla variação intra-específica e à sobreposição interespecífica verificada nestas contagens. O fato adquire mais relevo quando contraposto à considerável diversidade de espécies que o gênero abriga. A lista mais recente (Vanzolini 9) mostra que ele está atualmente composto por 22 espécies. Esta dificuldade tem deixado as diagnoses específicas principalmente centradas nos caracteres da escutelação cefálica e no padrão de colorido, eventualmente auxiliadas pelas contagens ventrais e subcaudais (Peters 4). A falta de uma revisão geograficamente abrangente tem dificultado muito a identificação correta das espécies. Os espécimes precisam ser sempre comparados com as descrições originais das espécies geograficamente mais próximas (Vanzolini 9). Neste contexto, é ao menos reconfortante dizer que a descrição de *Apostolepis arenarius* não vem apenas adicionar mais uma espécie a um gênero já problemático.

De todos as espécies de *Apostolepis* conhecidas, *A. arenarius* é a que apresenta o número mais baixo de escamas ventrais: 168-181; sempre acima de 200 nas demais espécies, o que permite sua diagnose imediata.

A situação de *Apostolepis gaboi* não é tão simples, mas é certo identificá-lo quando seus caracteres são contrapostos ao das demais espécies do gênero. Entre as espécies lineadas, apenas *Apostolepis niceforoi* e *Apostolepis nigroterminata* apresentam 7 linhas longitudinais. *Apostolepis niceforoi* é somente conhecido da Colômbia (La Pedrera) e possui um número de ventrais mais elevado que *A. gaboi* (248 contra 229) e um menor número de subcaudais (23 contra 31). *Apostolepis niceforoi* também apresenta apenas a quinta supralabial em contato com a parietal ao passo que em *A. gaboi* a quinta e sexta tocam a parietal. *Apostolepis nigroterminata* foi descrito de Cayaria: Loreto: Peru por Boulenger 2 e redescrito como *A. borelli* por Peracca 3 de Urucum no Estado de Mato Grosso. Como em *niceforoi* a nasal de *nigroterminata* toca a preocular e embora apresente a

quinta e sexta supralabial em contato com a parietal, o número de ventrais e subcaudais (208 + 32) difere nitidamente do encontrado em *A. gaboi*. Adicionalmente, a nasal de *nigroterminata* contacta a preocular ao passo que em *gaboi* a prefrontal separa as duas escamas. Finalmente, as faixas de *A. nigroterminata* são muito mais largas e a faixa dorsal é distintamente mais conspícua que as demais, o que não ocorre em *A. gaboi*.

A espécie lineada geograficamente mais próxima de *Apostolepis gaboi* é *longicaudata*, descrita de Engenheiro Dodt no Estado do Piauí. Além de apresentar apenas 5 faixas longitudinais, *A. longicaudata* tem um número de ventrais e subcaudais muito distinto (246 + 52) e entre os *Apostolepis* conhecidos é o que atinge o número mais elevado de subcaudais.

As demais espécies do gênero apresentam menos faixas longitudinais que *A. gaboi* ou um outro padrão de colorido completamente distinto. Por estes e outros detalhes do padrão de colorido, sempre apoiados por outros caracteres elas podem ser facilmente distinguidas de *A. gaboi*.

Os quatro espécimes de *Apostolepis arenarius* foram coletados enterrados na areia, juntamentte com grandes séries dos microteideos subterrâneos *Nothobachia ablephara* e *Calyptommatus leiolepis*. O único espécime de *Apostolepis gaboi* foi obtido em circunstâncias e habitat similares, cerca de 150 km ao sul no campo de dunas de Xique Xique (vide Rodrigues 5).

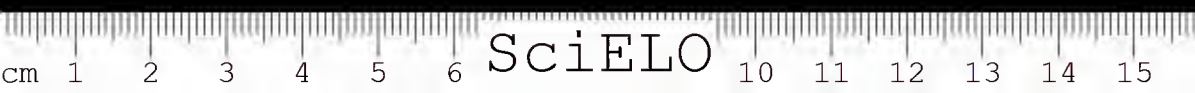
AGRADECIMENTOS

O trabalho de campo na área foi realizado com o auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo para o projeto ''Estudos sobre a ecologia e evolução da fauna das dunas interiores do Rio São Francisco''. Participaram deste projeto Yatiyo Yonenaga-Yassuda, do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e Sanae Kasahara, do Departamento de Biologia da UNESP (campus de Rio Claro). José Manoel Martins, Pedro Luis Bernardo da Rocha, Rosana Carvalho Moraes, Gabriel Skuk, Jean Pierre Ybert e Alina Fierros prestaram valiosa ajuda no campo. O trabalho foi realizado durante a vigência de uma bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Iara Lucia Laporta Ferreira e Giuseppe Puorto me facultaram acesso à coleção herpetológica do Instituto Butantan.

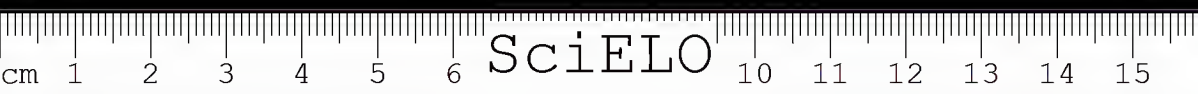
ABSTRACT: Two new species of *Apostolepis* are described from the palaeoquaternary sand dunes of the São Francisco river. *Apostolepis arenarius* is characterized by the lowest number of ventral scales known in *Apostolepis; Apostolepis gaboi* by the characteristic pattern of seven longitudinal stripes, number of ventral and subcaudal scales and cephalic pholidosis.

KEYWORDS: Taxonomy, Reptilia, Colubridae, *Apostolepis*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, A. Estudos sobre ofídios neotrópicos. Novas espécies de ophidios da Colombia. *Mem. Inst. Butantan*, p. 219-223, 1935.
2. BOULENGER, G.A. *Catalogue of snakes in the British Museum* (Natural History). British Museum, 1896. v.3.

RODRIGUES, M.T. Herpetofauna das dunas interiores do Rio São Francisco: Bahia. Brasil. V. Duas novas espécies de Apostolepis (Ophidia, Colubridae). Mem. Inst. Butantan, v. 54, n. 2, p. 53-59, 1992.

3. PERACCA, M.G. Viaggio del Dr. A. Borelli nel Mato Grosso Brasiliano e nel Paraguay, 1899. IX. Rettili ed amfibii. *Bol.Mus.Torino*, n. 19, 460, 1904.
4. PETERS, J.A., OREJAS-MIRANDA, B. Catalogue of the neotropical squamata. Part I. Snakes. *U.S.Nat.Mus.Bul.*, n. 297, p. 347, 1970.
5. RODRIGUES, M.T. Herpetofauna das dunas interiores do Rio São Francisco, Bahia, Brasil. I. Introdução à área e descrição de um novo gênero de microteiídeos *(Calyptommatus)* com notas sobre sua ecologia, distribuição e especiação (Sauria, Teiidae). *Papéis Avulsos Zool.*, S. Paulo, n. 37/19, p. 285-320, 1991.
6. RODRIGUES, M.T. Herpetofauna das dunas interiores do Rio São Francisco, Bahia, Brasil. II. *Psilophthalmus*: um novo gênero de microteiídeos sem pálpebra (Sauria, Teiidae). *Papéis Avulsos Zool*, S. Paulo, n. 37/20, p.321-327, 1991.
7. RODRIGUES, M.T. Herpetofauna das dunas interiores do Rio São Francisco, Bahia, Brasil. III. *Procellosaurinus*: um novo gênero de microteiídeos sem pálpebra, com a redefinição do gênero *Gymnophthalmus* (Sauria, Teiidae). *Papéis Avulsos Zool.*, S. Paulo, n. 37/21, p. 329-342, 1991.
8. RODRIGUES, M.T. Herpetofauna das dunas interiores do Rio São Francisco, Bahia, Brasil. IV. Uma nova espécie de *Typhlops* (Ophidia, Typhlopidae). *Papéis Avulsos Zool.*, S. Paulo, n. 37/22, p.343-346, 1991.
9. VANZOLINI, P.E. Addenda and corrigenda to the catalogue of neuotropical Squamata. *Smithsonian Herp. Inf. Serv.*, n. 70, 1986.
10. VANZOLINI, P.E. Two small species of *Amphisbaena* from the fossil dune field of the middle Rio São Francisco, state of Bahia, Brazil (Reptilia, Amphisbaenia). *Papéis Avulsos Zool.*, S. Paulo, n. 37/17, p.259-276, 1991.
11. VANZOLINI, P.E. Two further new species of *Amphisbaena* from the semi-arid northeast of Brazil (Reptilia, Amphisbaenia). *Papéis Avulsos Zool.*, S. Paulo, n. 37/23, p. 347-361, 1991.

Mem. Inst. Butantan
v. 54, n. 2, p. 61-67, 1992

MALFORMAÇÕES EM NINHADAS DE CAIÇACA, *BOTHROPS MOOJENI* (SERPENTES, VIPERIDAE)

Denis Vieira de ANDRADE
Augusto Shinya ABE

RESUMO: Evidências experimentais indicam que a incidência de malformações em serpentes na natureza é provavelmente baixa. No entanto, em ninhadas de *Bothrops moojeni* oriundas de fêmeas grávidas, coletadas no resgate da usina hidroelétrica de Três Irmãos, SP, a incidência de anomalias foi de 7,7%. As malformações observadas incluem irregularidades na folidose, desvios da coluna, enovelamento da coluna e bicefalia. As anomalias podem ter sido causadas pela exposição das fêmeas prenhes a temperaturas inadequadas em uma fase sensível do desenvolvimento embrionário, quando ilhadas, nas copas das árvores e arbustos, durante a elevação da água na represa.

UNITERMOS: Teratologia, bicefalia, temperatura, desenvolvimento embrionário, serpentes, represamento de rios, sudeste brasileiro.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de bicefalia em serpentes é rara, mas tem sido bem documentada na literatura (e.g. [1,2,3,4,6,23,27]). Belluomini[2] estima em aproximadamente 1/100.000 a razão deste tipo de anomalia, com base nas serpentes recebidas pelo Instituto Butantan em pouco mais de 50 anos. Em um inventário de todo o material de serpentes bicéfalas depositadas nas coleções do Instituto Butantan, Museu de Zoologia da USP e Instituto Pinheiros, Belluomini[2] conseguiu reunir apenas nove casos, entre mais de 700.000 exemplares.

Uma importante contribuição ao estudo da bicefalia e demais casos de malformações em répteis foi o trabalho de Nakamura[16], que apresenta uma chave

Departamento de Zoologia
Instituto de Biociências
UNESP — Caixa Postal 199
13506-900 — Rio Claro, SP — Brasil
Recebido para publicação em 12.03.92 e aceito em 31.07.92.

classificatória para os diversos tipos teratológicos. Posteriormente, com a descrição de novos casos de bicefalia, a chave de Nakamura[16] foi ampliada por outros autores 2, 27.

Neste estudo, descrevemos alguns casos de teratologia em embriões e neonato de *Bothrops moojeni* sugerindo uma provável causa do elevado índice de ocorrência da anomalia no material examinado.

MATERIAL

Durante o enchimento da represa da Usina Hidroelétrica de Três Irmãos, nos municípios de Araçatuba (21° 11'S; 50° 25'W.) e de Pereira Barreto (20° 38'S; 51° 06'W.), estado de São Paulo, recebemos vários exemplares de *B. moojeni*, coletados entre setembro de 1990 e março de 1991. Algumas das fêmeas desse lote de serpentes estavam grávidas e o exame dos embriões e neonatos revelou diversos casos de teratogenia. A descrição do material teratológico baseia-se em 4 exemplares, encontrados entre 52 examinados, oriundos de 3 ninhadas, dentre as 7 observadas.

RESULTADOS

Fêmea # 784 — comprimento rostro-anal de 875mm, revelou, por ocasião da necrópsia em 25-11-1991, a presença de quatro embriões no estágio 36 de desenvolvimento, de acordo com os critérios de Zehr[28], e um ovo atrésico. Dois dos embriões apresentavam as malformações descritas a seguir.

Caso 1. Exemplar macho, com hemipenis ainda evertido, bicéfalo, depositado sob o número 789 na coleção do Departamento de Zoologia, UNESP, Campus de Rio Claro (DZRC). As duas cabeças se fundem dorsalmente pela região parietal (Fig. 1). Ventralmente, a fusão mandibular situa-se na 2ª infralabial da cabeça direita e 5a. infralabial da cabeça esquerda. Há duas regiões mentonianas, que se fundem em uma única gular. As placas ventrais são ligeiramente mais largas que as demais, até a sexta, a partir da qual apresentam-se irregularmente duplicadas, com 8 placas pelo lado esquerdo e 19 pelo lado direito. A cabeça direita, com um desvio de 22° para a esquerda em relação ao eixo sagital do corpo, apresenta um entumescimento na região rostral e o olho esquerdo, saltado da órbita, não apresenta cristalino. Cabeça esquerda normal e com um desvio de 94°, também para o lado esquerdo. Corpo sem anomalias externas, tanto na folidose como na coloração.

Cabeça direita com 13,6mm de comprimento e a esquerda com 11,5mm. Comprimento da bifurcação ao ânus 174mm, cauda 37,4mm. Placas ventrais 180 do final da região duplicada até a placa anal; escamas subcaudais 67.

Como outros autores já ressaltaram anteriormente (e.g.[23]), é evidente a necessidade de uma melhor classificação para identificar o caso descrito. Todavia, ainda optamos pela chave de Nakamura[16], por sua flexibilidade. Assim, segundo os critérios de Nakamura[16], o bicéfalo descrito pode ser classificado como teratódimo opódimo, ou seja, como nível de bifurcação não ultrapassando os limites do crânio.

Caso 2. Exemplar fêmea, (DZRC nº 791), com acentuada compressão lateral da região parietal e três irregularidades ao longo da coluna. A primeira, um acentuado desvio da coluna, localiza-se ao nível da 20ª placa ventral. O segundo desvio, mais acentuado que o primeiro, situa-se na altura da 65ª placa ventral e o corpo eleva-se verticalmente, com desvio para a direita. A terceira irregularidade é a torção do tronco, que ocorre ao nível da 165ª placa ventral. Neste ponto o

FIG. 1. Vista dorsal do bicéfalo de *B. moojeni* mostrando a fusão das duas cabeças pela região parietal. Note a dilatação da região rostral (seta).

corpo faz torção da esquerda para a direita, expondo lateralmente as placas ventrais. Comprimento rostro-anal 212mm, cauda 37mm. Coloração e folidose normais (Supra-labiais 7/7; infra-labiais 7/8; dorsais 27; ventrais 204; sub-caudais 68).

Fêmea # 786 — Comprimento rostro-anal 1025mm, necropsiada em março de 1991, continha 7 embriões, no estágio 35 e 36 de desenvolvimento, e 7 ovos atrésicos. Um dos embriões apresentava malformações, relatadas a seguir.

Caso 3. Exemplar fêmea, (DZRC n.º 790), sem o cristalino do olho esquerdo e com fusão das placas ventrais, entre as de número 66 e a 96, além de dois pequenos desvios da coluna no terço posterior do corpo. Comprimento rostro-anal 109mm, cauda 13mm. Acentuadamente menor que os demais embriões e no estágio 35, ao passo que os demais, normais, estão no estágio 36. O menor tamanho não é devido a fusão das placas ventrais. Comprimento médio dos demais embriões: rostro-anal # 172,3 ± 7,1mm, cauda 33,6 ± 1,2. Coloração normal e folidose apresenta redução no número de placas ventrais (supra-labiais 7/7; infra-labiais 9/10, dorsais 25; ventrais 179; sub-caudais 65).

Em 9 de março de 1991, uma fêmea ainda mantida em cativeiro (comprimento rostro-anal aproximado de 1150mm) pariu 10 filhotes, um natimorto e 5 ovos atrésicos. Um dos neonatos apresentava as graves deformações abaixo descritas e morreu algumas horas após o nascimento.

Caso 4. Serpente de sexo não determinado (DZRC n° 788), com cabeça normal (supra-labiais 9/9; infra-labiais 10/10). O corpo é normal até a 18.ª placa ventral, a partir da qual se apresenta reduzido e enovelado, com a porção terminal e cauda enrondilhadas como nos estágios embrionários. Além da acentuada redução do corpo, o neonato apresenta a massa visceral evertida, onde podem ser reconhecidos a vesícula biliar, parte do tubo digestivo e massa de vitelo (Fig. 2). A região correspondente ao pulmão é extremamente reduzida, o que pode ter contribuído para a morte do animal. O volume da cabeça corresponde a aproxima-

damente 1/4 do total da serpente, que é muito menor que os demais exemplares da ninhada. A coloração é normal.

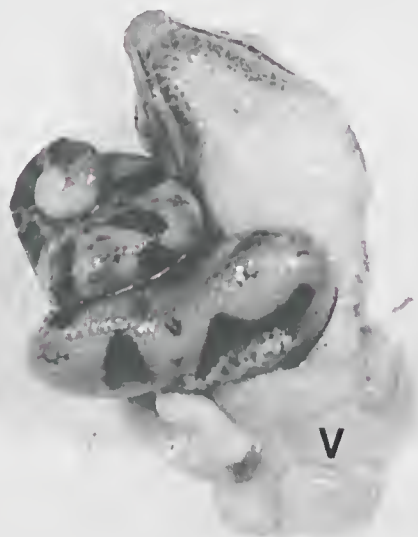



FIG. 2. Vista ventral de *B. moojeni*, caso 4 (DZRC nº 788), mostrando a porção terminal do corpo e cauda enrodilhadas e a massa visceral evertida (V). Note o volume desproporcional da cabeça em relação ao total do corpo.

DISCUSSÃO

A ocorrência de anomalias em répteis pode estar relaciomada às condições que os embriões experimentam em determinados estágios do desenvolvimento. Nos répteis ovíparos, o baixo teor de umidade ou a temperatura inadequada durante a incubação causam a morte ou deformidade do embrião. Lynn & Ullrich[14] demonstraram, experimentalmente, que a exposição esporádica de ovos de quelônios a condições de pouca umidade pode provocar anomalias de variados graus nos neonatos, tanto na escutelação como na forma da carapaça e do plastrão. A exposição a condições de pouca umidade pode ser letal durante os primeiros estágios de desenvolvimento, mas os sobreviventes se apresentam normais [14]. No entanto, quando o estresse de água ocorreu em estágios mais avançados do desenvolvimento embrionário, surgiram anomalias[14]. Estes dados indicam que há estágios críticos do desenvolvimento embrionário, em que o estresse de água pode produzir malformações[14].

A temperatura tem grande influência no desenvolvimento embrionário dos répteis, podendo inviabilizar a ninhada, determinar o sexo (veja[19] para revisão) ou causar teratologias de várias ordens. A incubação dos ovos em temperaturas subletais, tanto baixas como elevadas, pode causar anomalias na escutelação, no colorido ou deformidades diversas[5,25,26]. Também nas serpentes vivíparas, a temperatura de manutenção das fêmeas prenhes influi na velocidade do desenvolvimento embrionário e pode causar anomalias[8,9,28].

As malformações em répteis na natureza, aparentemente causadas por efeitos ambientais, parecem ocorrer com uma certa freqüência. Lynn & Ulrich[14] re-

latam anomalias na escutelação da carapaça de quelônios iguais àquelas provocadas experimentalmente. King[11] relata a ampla ocorrência da duplicação de vértebras em serpentes, anomalia que pode ser causada pelo efeito da temperatura[18]. Embora Belluomini[1] tenha estimado em 1/100.000 a freqüência de bicéfalos, não há dados para outras anomalias na natureza.

A elevada incidência de exemplares teratológicos, na ordem de 7,7%, no material de *B. moojeni* examinado é intrigante. As anomalias descritas certamente não permitiriam a sobrevivência dos espécimes malformados. O fato de não se observar nenhuma anormalidade de menor grau, como coluna vertebral tortuosa ou cauda torcida (e.g.[26]), entre centenas de exemplares examinados durante o resgate, indica a sua raridade.

Osgood[18] submeteu fêmeas grávidas de *Natrix fasciata*, espécie vivípara, a diferentes tratamentos, em temperaturas variáveis ou fixas, comparando as ninhadas delas resultantes com animais controle, procedentes da natureza. A incidência de anomalias consideradas graves foi de 1,3% em ninhadas procedentes da natureza. Em serpentes submetidas a temperaturas constantes, baixas e altas, as anomalias foram de 3,8 e 6,4%, respectivamente. As ninhadas de serpentes mantidas em condições de grande amplitude de variação da temperatura, entre 18,3 e 26,7°C, durante a noite e o dia, respectivamente, apresentaram 7,5% de anomalias[18].

Com o enchimento da represa de Três Irmãos, a várzea do rio Tietê e de seus tributários foi alagada, deslocando as serpentes de seus ambientes e refúgios habituais. Os exemplares de *B. moojeni* coletados durante o resgate ficavam freqüentemente ilhados, nas copas das árvores e arbustos, ou restos de vegetação flutuante. Nestes locais as serpentes ficavam sujeitas a variações da temperatura, que devem ter sido distintas daquelas que buscam durante as atividades habituais[13]. Baseando-se no tempo de gestação em *B. moojeni*[12] e na época de resgate das serpentes, é razoável supor que as fêmeas prenhes ficaram expostas a temperaturas críticas e inadequadas, enquanto ilhadas. Ademais, a incidência de malformações, em porcentagens próximas aos valores relatados por Osgood[18], reforça a possibilidade de que a temperatura possa ter sido a causa das anomalias.

Federsoni[7] relata, em três ninhadas de *B. atrox*, consangüíneas, nascidas em cativeiro, a elevada incidência de anomalias, variando de 3,4 a 26,6%. Os teratogênicos de *B. atrox* apresentam variados graus de anomalia, uma das quais com a parte posterior do corpo enovelada, semelhante ao caso 4, aqui descrito para *B. moojeni*. A anomalia observada em *B. atrox* foi denominada teratelessomaturo, ou seja, a teratogenia na porção distal do corpo e cauda[7]. Esta classificação não seria aplicável ao caso 4 de *B. moojeni*, pois a teratologia atinge também a porção anterior do corpo. A classificação desta teratogenia, porém, seria irrelevante, pois pouco ilustra o aspecto da anomalia.

Federsoni[7] sugere que a causa das teratogenias observadas nas ninhadas de *B. atrox* pode ter sido a consagüinidade, pois as ninhadas dos exemplares parentais, procedentes da natureza e mantidos sob as mesmas condições, não apresentaram anomalias. As serpentes prenhes descritas por Federsoni[7], foram mantidas a 19 — 23°C durante o inverno e 24 — 29°C no verão. Considerando--se as datas em que as serpentes pariram e as informações sobre o tempo de gestação em *Bothrops* (e.g.[12,15,20]), não fica afastada a hipótese de que os embriões de *B. atrox* tenham experimentado temperaturas excessivamente baixas ao fim do inverno. Exposições a temperaturas na ordem de 18 — 22°C produzem elevada porcentagem de anomalias, mesmo em serpentes vivíparas de regiões temperadas, como *Natrix fasciata*[18]. Todavia, a elevada incidência de anomalias

registradas por Federsoni[7], de até 26,6%, sugere que outras variáveis, além da temperatura, podem estar envolvidas.

Em répteis a viviparidade permite o desenvolvimento dos embriões sob condições menos variáveis de temperatura, graças ao comportamento termorregulatório da fêmea grávida[21, 22]. A viviparidade ou a capacidade de manutenção de uma temperatura adequada ao desenvolvimento dos embriões pode ampliar a distribuição geográfica das serpentes[10, 17, 24]. Porém, as limitações à capacidade de manutenção da temperatura ideal, por termorregulação, podem restringir o estabelecimento de uma espécie a um dado ambiente. Esse estabelecimento pode ainda ser agravado pelo surgimento de anomalias, decorrentes das temperaturas inadequadas durante o desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT: Experimental evidences has shown that malformations and gross anomalies in nature probably occur in low frequency. In clutches of gravid females of *Bothrops moojeni* collected during animal rescuing activity at the Três Irmãos hydroelectric reservoir, in the State of São Paulo, however, the incidence of anomalies was 7,7%. Malformations included meristic anomalies, kinks and curling of vertebral column, and bicephaly. Anomalies might be due to the effect of inadequate temperatures during the development of the embryos. The gravid females sought shelter on the top of trees and bushes during the filling of the reservoir, being often exposed to wide temperature variations.

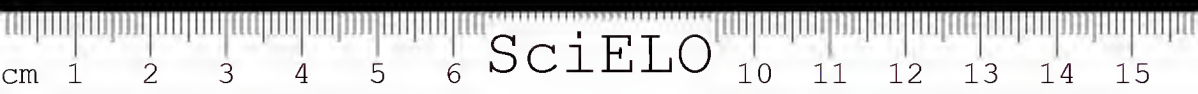
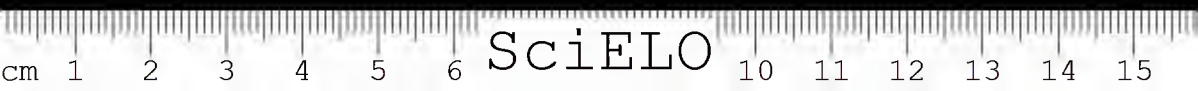
KEYWORDS: Teratology, bicephaly, temperature, embryo development, snakes, river damming, southeastern Brazil.

AGRADECIMENTOS

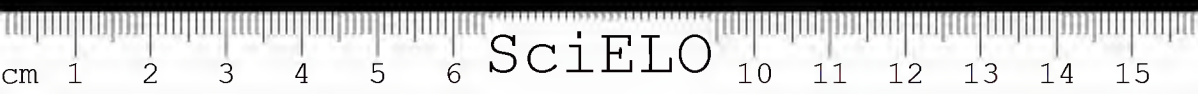
Desejamos consignar nossos agradecimentos à CESP, Companhia Hidroelétrica do Estado de São Paulo, pelo apoio logístico durante a excursão para a UHE de Três Irmãos e pela doação de serpentes coletadas durante o resgate. Agradecemos a O. C. P. Segura e Dr. C. B. F. Haddad, pela leitura crítica do manuscrito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BELLUOMINI, H.E. Bicefalia em *Xenodon merremi* (Wagler 1824) (Serpentes) (Descrição de um teratódimo deródimo). *Mem. Inst. Butantan, v. 28*, p. 85-89, 1957/1958.
2. BELLUOMINI, H.E. Serpenti bicefali — Revisioni del materiale existente nell'Instituto Butantan, Departamento de Zoologia e nell'Instituto Pinheiros, SP, Brasil. *Arch. Zool. Italiano, v. 50*, p. 129-144, 1965.
3. BELLUOMINI, H.E., LANCINI, A. R. Bicefalia em *Leptodeira annulata ashmeadii* (Hallowell 1825) (Serpentes). Descrição de um teratódimo deródimo. *Mem. Inst. Butantan, v. 29*, p. 175-180, 1959.
4. BELLUOMINI, H.E., BIASI, P. de, PUORTO, G., BORELLI, V. Bicefalia em *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti) [Serpentes: Viperidade: Crotalinae]. *Mem. Inst. Butantan, v. 40/41*, p. 117-121, 1977.
5. BUSTARD, H. R. Tail abnormalities in reptiles resulting from high temperature egg incubation. *Brit. J. Herpet., v. 4*, p. 121-124, 1969.
6. CUNHA, O.R. Um teratódimo deródimo em jibóia *(Constrictor constrictor constrictor)* (Linn. 1756) (Ophidia; Boidae). *Bol. Mus. Paraense Emílio Goeldi*, n. 67, p. 1-17, 1968.

7. FEDERSONI JR., P.A. Casos teratogênicos em *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan, v. 42/43*, p. 49-64, 1979.
8. FOX, W. Effect of temperature on development of scutellation in the garter snake, *Thamnophis elegans atratus. Copeia*, p. 252-262, 1948.
9. FOX, W., GORDON, C., FOX, M. J. Morphological effects of low temperatures during the embrionic development of the garter snake *Thamnophis elegans. Zoologica, v. 46*, p. 57-71, 1961.
10. GREER, A. E. Mode of reproduction in the squamate fauna of three altitudinally correlated life zones in east Africa. *Herpetologica, v. 24*, p. 229-232, 1968.
11. KING, W. Vertebra duplication, an osteological anomaly widespread in snakes. *Herpetologica, v. 15*, p. 87-88, 1959.
12. LELOUP, P. Observations, sur la reproduction de *Bothrops moojeni* Hoge en captivité. *Acta Zool. Pathol. Antverpiensia*, n. 62, p. 173-201, 1975.
13. LELOUP, P. Various aspects of venomous snake breeding on a large scale. *Acta Zool. Pathol. Antverpiensia*, v. 1, p. 177-198, 1984.
14. LYNN, W. G., ULLRICH, M. C. Experimental production of shell abnormalities in turtles. *Copeia*, p. 253-262, 1950.
15. MURPHY, J. B., MITCHELL, L. A. Miscelaneous notes on the reproductive biology of reptiles. 6. Thirteen varieties of the genus *Bothrops* (Serpentes, Crotalidae). *Acta Zool. Pathol. Antverpiensia, v. 1*, p. 199-214, 1984.
16. NAKAMURA, K. Studies on some specimens of double monsters of snakes and tortoises. *Mem. Col. Sci. Kioto Imp. Univ.: Ser. B*, v. *14*, p. 171-191,1938.
17. NEILL, W. T. Viviparity in snakes: some ecological and zoogeographical considerations. *Amer. Natur., v. 98*, p. 35-55, 1964.
18. OSGOOD, D. W. Effects of temperature on the development of meristic characters in *Natrix fasciata. Copeia*, p. 33-47, 1978.
19. PAUKSTIS, G.L., JANZEN, F. J. Sex determination in reptiles: summary of effects of constante temperatures of incubation on sex ratios of offspring. *Smithsonian Herpet. Inf. Serv.*, n. 83, p. 1-28, 1990.
20. PEZZANO, V. Reproduction of *Bothrops alternatus* (Duméril, Bribon & Duméril, 1854) in captivity. *Litteratura Serpentium, v. 6*, p. 13-19, 1986.
21. SHINE, R. The evolution of viviparity in reptiles: an ecological analysis. In: GANS, C., BILLETT, F., eds. *Biology of the reptilia*. New York: John Wiley, 1985 v. 15, p. 606-694.
22. TINKLE, D. W., GIBBONS, J. W. The distribution and evolution of viviparity in reptiles. *Mis. Publ. Mus. Nat. Hist. Univ. Michigan, v. 154*, p. 1-55, 1977.
23. VANZOLINI, P. E. Notas sobre um deródimo de *Crotalus durissus terrificus* (Laur.) *Pap. Av. Dep. Zool., SP, v. 8*, p. 273-283, 1947.
24. VAZ-FERREIRA, R., ZOLESSI, L. C. de, ACHÁVAL, F. Oviposicion y desarrollo de ofidios y lacertilios en hormigueros de *Acromyrmex. Physis, v. 29*, p. 431-459, 1970.
25. VINEGAR, A. The effect of temperature on the growth and development of embryos of the indian python, *Python molurus* (Reptilia: Serpentes: Boidae). *Copeia*, p. 171-173, 1973.
26. VINEGAR, A. Evolutionary implications of temperature induced anomalies of development in snakes embryos. *Herpetologica, v. 30*, p. 72-74, 1974.
27. VIZOTTO, L. D. Bicefalia em *Phylodryas olfersii* (Lichtenstein, 1823) (Ophidia; Colubridae). *Naturalia*, v. 1, p. 69-76, 1975.
28. ZEHR, D. R. Stages in the normal development of the common garter snake, *Thamnophis sirtalis sirtalis. Copeia,* p. 332-329, 1962.

Mem. Inst. Butantan
v. 54, n. 2, p. 69-81, 1992

COLETÂNEA DE RESUMOS DE TRABALHOS PUBLICADOS PELOS PESQUISADORES DO INSTITUTO BUTANTAN (1991)

COMISSÃO EDITORIAL. Coletânea de resumos de trabalhos publicados pelos pesquisadores do Instituto Butantan (1991). **Mem. Inst. Butantan**, v. **54**, n. 2, p. 69-81, 1992.

1. ALVES, R.C.B., GUSMÃO, V. de A., FEIJÓ, I.C., HISS, H., SOUZA, M.D.C., CARLOS, S.Z.F.
Vacina BCG líquida: influência do tempo de congelamento a 20°C sobre a viabilidade.
Arq. Biol. Tecnol., *v. 34*, n. 3/4, p. 555-559, 1991.

Abstract: The authors studied the influence of the storage time at − 20°C on the oxygen uptake rates of the liquid BCG vaccine. It was concluded that 15 days represents a suitable period of storage.

Resumo: Os autores estudaram a influência do tempo de estocagem à − 20°C através da taxa de consumo de oxigênio da vacina BCG líquida. Concluiu-se que 15 dias representam um período aceitável de estocagem.

2. BELLUOMINI, H.E., BIASI, P. DE, PUORTO, G., FERNANDES, W., DOMINGUES, A.L.
Amostras de população de *Bothrops atrox* (Linnaeus 1758) apreciadas nas quantidades de veneno obtidas e dados ecológicos (Serpentes: Viperidae: Crotalinae)
Bol. Mus. Paran. Emilio Goeldi, Sér. Zool., *v.7*, n.1, p. 53-69, 1991.

Abstract: The authors present and analyze data from a population of *Bothrops atrox* (Linnaeus 1758), represented by 294 specimens, and discuss the relationship between the snakes length and sex; the amount of venom (dry weight) obtainned by the snakes size and sex; and size distribution and maximum minimum values by sex. Ecological data are given for the collection locality at Curral Grande, Monte Alegre, Pará State, northern Brazil. Male specimens were more common. 94.5% of the specimens were between 60 and 105cm in length. Small lizards were the dominant food item of the snakes. Snakes of up to 60cm in length produced as much as 20mg of dry venom. 94.9% of the specimens produced venom in quantities that reached as high as 100mg dry weight. The authors caution that published observations on *B. atrox* may actually refer to *Bothrops moojeni* Hoge 1966, if published before the recognition of these two species.

Resumo: Amostras de uma população da serpente Bothrops atrox (Linaeus 1758), num total de 294 exemplares, são apresentadas e discutidas segundo o sexo das serpentes, as quantidades de veneno seco obtidas pelo comprimento das serpentes e sexo; quantidades de veneno seco em seus valores máximo e mínimo nas diferentes amostras; resumo para machos e fêmeas dos valores extremos de comprimento e peso. São apresentados dados ecológicos das serpentes na localidade de coleta, Curral Grande, Monte Alegre, Pará, Brasil. Conclui-se pela predominância de exemplares machos nas amostras; 94,5% das serpentes têm entre 60 e 105cm de comprimento; pequenos lagartos são o alimento predominante; serpentes com até 60cm de comprimento produziram até 20mg de veneno seco. Quantidades de até 100mg de veneno foram obtidas de 94,9% dos exemplares. Destaca-se que dados da leitura para *B. atrox* podem pertencer a *Bothrops moojeni* Hoge 1966, antes do desdobramento das espécies.

3. BRAUNWALD, J., NONNENMACHER, H., PEREIRA, C.A., KIRN, A.
Increased susceptibility to mouse hepatitis virus type 3 (MHV3) infection induced by a hypercholesterolaemic diet with increased adsorption of MHV 3 to primary hepatocyte cultures.
Res. Virol., **v.142**, p. 5-15, 1991.

Abstract: The administration of a hypercholesterolaemic (HC) diet rendered genetically resistant A/J mice susceptible to mouse hepatitis virus 3 (MHV3) infection. The animals died of acute hepatitis with high viral titres in the liver accompanied by many necrotic foci and high serum transaminase levels. Resistance to virus was re-established by refeeding HC mice with a normal diet for 2 weeks. This modification of pathogenesis was accompanied by an increase in the susceptibility of hepatocyte cultures from HC mice to MHV3 and could be explained by an enhancement in virus adsorption. We hypothesize that the incorporation of cholesterol into the plasma membranes of hepatocytes of HC mice, thereby decreasing the membrane fluidity, may lead to an increase in the availability of virus receptors.

Resumo: A administração de uma dieta hipercolesterolemica (HC) torna camundongos A/J geneticamente resistentes, susceptíveis à infecção pelo virus da hepatite murina 3 (MHV3). Os animais morreram de hepatite aguda com altos títulos virais no fígado acompanhados de muitos focos necróticos e altos níveis de transaminase no soro. A resistência ao virus foi restabelecida por realimentação dos camundongos HC com a dieta normal por 2 semanas. Esta modificação da patogenicidade foi acompanhada de uma susceptibilidade aumentada de culturas de hepatocitos de camundongos HC ao MHV3 e pode ser explicada por um aumento de adsorção do virus. Nós sugerimos que a incorporação de colesterol na membrana plasmática de hepatocitos de camundongos HC, introduzindo diminuição de fluidez de membrana, pode levar a um aumento na disponibilidade de receptores para o virus.

4. BRUNNER JR., A., RIZZO, E. DE, SPADACCI-MORENA, D.D.
Hemoglobin biosynthesis enhancement following mitochondrial membrane growth and differentiation.
Comp. Biochem. Physiol., *v.98B*, n. 2/3, p. 227-232, 1991.

Abstract. A quantitative increase of organelles in early reticulocytes has been observed compared to that found in late erythroblasts of the peripheral rabbit embryo blood. The increase is due to the formation of hemosomes, organelles taken as sites for final hemoglobin (Hb) biosyntesis or were the assembly of heme and globin polypeptides could occur. These organelles derive indirectly from mitochondria whose internal membrane grows concomitantly to its differentiation, originating lamellated bodies that modify, successively, to prehemosomal vesicles, prohemosomes and hemosomes. The occurrence of membrane synthesis for the formation of lamellated bodies could explain the increase of organelles per cell and, thereby, the enhancement of the Hb biosyntesis

rate in peripheral embryo blood in relation to this biosynthesis rate in the liver, as had been biochemically ascertained by other authors.

Resumo: Um aumento quantitativo de organelos foi observado em reticulócitos recém-constituído, em comparação aos eritroblastos ortocromáticos, no sangue periférico de embriões de coelho. O aumento é devido à formação de hemossomos, organelos nos quais ocorreria a biossíntese final da hemoglobina (Hb), ou seja, a integração do hemo aos polipeptídeos globínicos e a agregação dessas subunidades. Esses organelos derivam indiretamente das mitocôndrias, cuja membrana interna cresce concomitantemente a uma diferenciação, dando origem a corpos lamelados que se modificam, sucessivamente, em vesículas prehemossômicas, prohemossomos e hemossomos. A ocorrência de síntese de membrana para formação de corpos lamelados poderia explicar o aumento de organelos por célula e, conseqüentemente, o incremento da biossíntese de Hb no sangue periférico do embrião em relação a esta biossíntese no fígado, como tinha sido verificado bioquimicamente por outros autores.

5. CARNEIRO, S.M., PINTO, V.R., JARED, C., LULA, L.A.B.M., FARIA, F.P., SESSO, A.
Morphometric studies on venom secretory cells from *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu) before and after venom extraction.
Toxicon, v. 29, n. 6, p. 569-580, 1991.

Abstract: A comparative morphometrical analysis was carried out on secretory cells from *Bothrops jararacussu* venom glands, before manual extraction of the venom (milking) and 4 and 8 days after milking. At the 8th day after milking, the cytoplasmic volume increased by 160%. The rough endoplasmic reticulum (RER) volume density increase, up to the 8th day after milking, is mainly due to widening of the intra-scisternal space. The total volume and membrane surface of the RER, Golgi apparatus and subcomponents, secretory vesicles and mitochondria, increased during the experimental period whilo the volume and surface densities of these organelles, with the exception of the RER, did not vary The numerical density of Golgi associated microvesicles per Golgi volume unit also increased. The greatest relative increments in these parameters occurred within the first 4 days. These results are compatible with an increased rate of membrane synthesis and transport in the milked glands and suggest that the membrane biogenesis, degradation and circulation that takes place in the first week after milking is achieved through coordinated cellular mechanisms that maintain the rate between total membrane surface and total cytoplasmic volume unaltered.

Resumo: Foi feita análise morfométrica comparativa entre células secretoras da glândula de veneno de *Bothrops jararacussu*, antes da extração manual do veneno e após 4 e 8 dias da extração. No 8º dia, o volume citoplasmático aumentou em 160%. O aumento da densidade de volume do retículo endoplasmático granular (REG) até o 8º dia após a extração é devida principalmente à dilatação do espaço intracisternal. O volume total e a superfície de membranas do REG, aparelho de Golgi e seus subcomponentes, vesiculas secretoras e mitocôndrias, aumentaram durante o período experimental enquanto as densidades de volume e de superfície dessas organelas, com exceção do REG, não variaram. A densidade numérica de microvesículas associadas ao Golgi, por unidade de volume do Golgi também aumentou. Os mais elevados aumentos relativos desses parâmetros ocorreram dentro dos 4 primeiros dias após a extração do veneno. Estes resultados são compatíveis com aumento da velocidade de síntese e de transporte de membranas na glândula após extração e sugerem que a biogênense, a degradação e à circulação de membranas durante a 1ª semana após extração do veneno é feita através de mecanismos celulares coordenados que mantêm inalterada a relação entre superfície total de membranas e o volume citoplasmático.

6. COSTA ROSA, L.F.B.P., CURY, Y., CURY, R.
Hormonal control of macrophage function and glutamine metabolism.
Biochem. Cell Biol., v. 69, p. 309-312, 1991.

Abstract: Murine macrophages have been reported to utilize glutamine at high rates. However, the role of glutamine in macrophage function is still unknown. In the present study, the maximum glutaminase activity of macrophages was investigated under several endocrine dysfunctions that are known to cause alterations in macrophage function. The results obtained suggest that glutamine might play an important role in the onset of phagocytosis in inflammatory macrophages. Moreover, the studies show that insulin, glucocorticoids, and thyroid hormones may be responsible for the regulation of glutamine metabolism and, consequently, of macrophage function.

Resumo: Dados recentes têm demonstrado que macrófagos de ratos utilizam quantidades elevadas de glutamina. Contudo, o papel deste aminoácido para a funcionalidade destas células não é ainda conhecido. No presente trabalho, a atividade máxima da enzima glutaminase foi investigada em macrófagos, na vigência de diversas disfunções hormonais, responsáveis por alterações na funcionalidade destas células. Os resultados obtidos indicam que a glutamina tem papel importante para o processo de fagocitose em macrófagos inflamatórios. Além disso, estes estudos sugerem que a insulina, os glicocorticóides e os hormônios tiroidianos são capazes de regular o metabolismo da glutamina e, conseqüentemente, a função de macrófagos.

7. DIAZ, A.M., ALBAS, A., VALENTINI, E.J.G., PERDOMO, G.
Evaluación de la calidad de los reactivos que se utilizan en la tecnica de contrainmunoelectroforesis para la determinación de anticuerpos antirrábicos.
Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, v. 33, n.1, p. 44-49, 1991.

Abstract: En este estudio se comprobó que el Instituto Butantan produce antígenos y sueros indicadores que se pueden utilizar con éxito en la prueba de contrainmunoelectroforesis para titular anticuerpos antirrábicos en personas inmunizadas. No se pudieron demostrar diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de las pruebas de estandarización realizadas en el Instituto Butantan y las pruebas de control de referencia llevadas a cabo en el Centro Panamericano de Zoonosis. Se propone que el Instituto Butantan produzca y distribuya a nivel nacional los reactivos para que los laboratorios de diagnóstico apliquen la técnica de contrainmunoelectroforesis para la determinación de anticuerpos antirrábicos.

Resumo: Neste estudo comprovou-se que o Instituto Butantan produz antígenos e soros indicadores que podem ser usados, com êxito, na prova de contraimunoeletroforese para titular anticorpos anti-rábicos em pessoas imunizadas. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados das provas de estandartização realizadas no Instituto Butantan e das provas de controle de referência realizadas no Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO). Propõe-se que o Instituto Butantan produza e distribua, a nível Nacional, os reativos para que os laboratórios de diagnóstico utilizem a técnica de contraimunoforese para a determinação de anticorpos anti-rábicos.

8. FERNANDES, I., TAKEHARA, H.A., MOTA, I.
Isolation of horse IgG with protein A.
Brazilian J. Med. Biol. Res., *v.24*, p. 1129-1131, 1991.

Abstract: Horse immunoglobulins were obtained from normal serum defatted with dextran sulfate and precipitated with ammonium sulfate. Eight mg of this preparation was submitted to affinity chromatography with protein A-Sepharose CL-4B. Low temperature (4°C) and a starting buffer at pH 8.0 were conditions required for all IgG subclasses to bind to protein A, even those with low affinity. The IgGs bound to protein A were eluted with glycine buffer at pH 2.8. The yield was about 90%. It is suggested that isolated IgG, instead of whole Igs, be used in serum therapy, reducing the amount of Igs and diminishing serum-related reactions.

Resumo: As imunoglobulinas de cavalo foram obtidas de soro normal deslipidado com sulfato de dextran e precipitado com sulfato de amônio. Oito miligramas desta preparação foram submetidos a cromatografia de afinidade com proteina A — Sepharose 4B. Uma temperatura baixa (4°C) e um tampão inicial de pH 8.0 são condições necessárias para que toda a IgG ligue-se à proteina A, mesmo aquelas de baixa afinidade. As imunoglobulinas foram eluidas com tampão glicina pH 2.8. O rendimento foi de cerca de 90%. Sugere-se o uso de IgG isolada em vez de soro total na imunoterapia do envenenamento, o que reduziria a quantidade de proteína injetada e reações adversas.

9. FERNANDES, I., TAKEHARA, H.A., MOTA, I.
Isolation of IgG_T from hyperimmune horse anti-snake venom serum: its protective ability.
Toxicon, *v.29*, n.11, p. 1373-1379, 1991.

Abstract: Hyperimmune horse anti-bothropic serum, used in serum therapy, was analyzed for its IgG_T content and protective ability. IgG_T was isolated through a combination of salt-mediated hydrophobic chromatography and protein A affinity chromatography. The chromatographic fractions obtained were analyzed with regard to their isotype content and protective ability. The results suggest that the protective ability of hyperimmune antivenom serum is located mainly in the IgG_T subclass.

Resumo: Analisou-se o teor de IgG_T e a capacidade protetora de soro hiperimune anti-botrópico produzido em cavalos. A IgG_T foi obtida por uma combinação de cromatografia hidrofóbica mediada por sais e cromatografia e afinidade por proteina A. As frações cromatográficas obtidas foram analisadas quanto ao seu conteúdo em isótipos e capacidade protetora. Os resultados sugerem que a capacidade protetora do soro antiveneno botrópico está localizada principalmente na subclasse IgG_T.

10. IOSHIMOTO, L. M., FLOETER-WINTER, L. M., WINTER, C. E., BEÇAK, W., AFFONSO, M.H.T.
Genetic characterization of lactose fermentation and antibiotic resistance in plasmid-harboring enteric bacteria isolated from Amazon amphibians.
Rev. Brasil. Genet., *v.14*, n. 4, p. 859-871, 1991.

Abstract: Aerobic gram-negative bacteria were isolated from the feces of 20 wild amphibians. The animals were collected from regions flooded by the waters of the Tocantins river during the building of the Tucuruí-PA hydroelectric plant. Of the 420 isolates tested for the presence of plasmids, 123 (29%) showed at least one plasmid DNA band. Among the 123 plasmid containing isolates, 89% were lactose fermenting, 41% showed resistance to ampicillin, 6.5% to streptomycin and 6.5% to tetracycline, at levels ≥ 10 µg/ml. The most prevalent genera identified among the 123 bacterial isolates were the *Citrobacter* (67%), followed by *Enterobacter* (16%), *Klebsiella* (6%), *Providencia* (3%), *Escherichia* (3%), *Proteus* (2%), *Aeromonas* (2%) and *Salmonella* (1%). As most of the detected plasmids were large enough to carry genes for conjugal transfer, the relationship between the presence of plasmids and characteristics such as lactose fermentation and drug resistance was analyzed by mating to *E. coli*. The presence of these genes was also examined by DNA-DNA hybridization, using specific probes.

Resumo: Bactérias aeróbicas gram-negativas foram isoladas de fezes de 20 anfíbios. Os animais foram capturados na região que seria inundada para a formação da represa da Usina Hidrelétrica de Tucuruí-PA. Entre as 420 colônias bacterianas analisadas, 123 (29%) eram portadoras de plasmídios, sendo: 89% capazes de fer-

mentar a lactose, 41% resistentes à ampicilina, 6,5% à estreptomicina e 6,5% à tetraciclina, em níveis ≥ 10 µg/ml. O gênero predominante entre as 123 amostras foi o *Citrobacter* (67%), seguido de *Enterobacter* (16%), *Klebsiella* (6%), *Providencia* (3%), *Proteus* (2%), *Aeromonnas* (2%) e *Salmonella* (1%). Como grande parte dos plasmídios detectados tinha pesos moleculares suficientes para conter genes capazes de promover sua auto-transferência, a correlação entre a presença dos mesmos e algumas características observadas foi investigada por conjugação. A presença destes genes foi também analisada por segregação natural e induzida, e por hibridização DNA-DNA, através de sondas radioativas. Os resultados não demonstraram a presença de plasmídios R, Illy, ou Lac nestas amostras, mas foram encontradas evidências de que os caracteres de fermentação de lactose e produção de hemolisinas são mediados por genes presentes nos cromossomos destas bactérias.

11. JANCAR, S., TEIXEIRA, C.F.P., LIMA, W.T. de, FUJIMURA, A.Y.H., SIROIS, P.
Inhibitory effect of econazole on the release of thromboxanes.
Agents Actions, v. *34*, n. 3/4, p. 387-392, 1991.

Abstract: The effect of econazole on the release of thromboxanes was investigated. It was found that econazole inhibited concentration-dependently the aggregation of guinea pig platelets stimulated with arachidonic acid. The compound also redduced significantly the LTB_4 — induced contraction of guinea pig lung parenchyma strips and the contraction of rabbit aorta to the effluent of LTD_4 — stimulated guinea pig lungs, both effects mediated mostly by thromboxane generation. The concentration of TXB_2 in the effluents from LTD_4 stimulated lungs, assayed by EIA, was significantly reduced following pretreatment of the lungs with 10^{-4} *M* and 10^{-5} *M* of econazole, whereas the levels of PGE_2 were increased. These results demonstrate that econazole is a selective inhibitor of thromboxane synthesis.

Resumo: Foi investigado o efeito do econazol sobre a liberação de tromboxanas. Verificou-se que o econazol inibe a agregação de plaquetas de cobaia estimuladas por ácido araquidônico de maneira dependente de sua concentração. O composto também reduz significativamente a contração de tiras de parênquima pulmonar induzidas por LTB4 e a contração da aorta de coelho causada pelo efluente do pulmão de cobaias estimulado por LTD4, efeitos esses mediados principalmente pela geração de tromboxana. A concentração de TXB2 nos efluentes de pulmão estimulado por LTD4, determinada por EIA, foi significativamente reduzida após tratamento dos pulmões com econazol 10^{-4}M e 10^{-5}M, enquanto os níveis de PGE_2 foram aumentados. Esses resultados demonstram que o econazol é um inibidor seletivo da síntese de tromboxana.

12. KAMIGUTI, A.S., CARDOSO, J.L.C., THEAKSTON, R.D.G., SANO-MARTINS, I.S., HUTTON, R.A., RUGMAN, F.P., WARREL, D.A., HAY, C.R.M.
Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil.
Toxicon, v *29*, n. 8, p. 961-972, 1991.

Abstract: Thirty-four patients envenomed by *Bothrops jararaca* in Brazil were studied. Of these, 20 (59%) had incoagulable blood associated with local and or systemic bleeding and 10 of the 20 were thrombocytopenic. Among 14 patients with coagulable blood, 6 (43%) had bleeding symptoms and 3 (21%) were thrombocytopenic. High levels of von Willebrand $factor_{(vWF)}$, plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and tissue type plasminogen activator (t-PA) antigens were also recorded in some patients with systemic bleeding with or without incoagulable blood. These substances may have been released from endothelial cells. Admission serum venom antigen levels were similar in both groups. The study indicated that systemic haemorrhage may occur in patients with coagulable blood and thrombocytopenia and that coagulopathy is not therefore the primary cause of haemorrhage.

Resumo: Foram estudados 34 pacientes que sofreram envenenamento acidental humano no Brasil. Desses, 20 (59%) apresentaram sangue incoagulável associado com sangramento local e/ou sistêmico e 10 dos 20 tiveram trombocitopenia. Entre os 14 pacientes com sangue incoagulável 6 (43%) apresentaram sangramentos e 3 (21%), trombocitopenia. Em alguns pacientes com sangramento sistêmico, com ou sem sangue incoagulável, foram observados níveis elevados de fator de von Willebrand (vWF), inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e antígeno do ativador do plasminogênio tissular (t-PA). Essas substâncias devem ter sido liberadas das células endoteliais. Na admissão, os níveis do veneno no soro eram semelhantes em ambos os grupos. O presente estudo evidenciou que a hemorragia sistêmica pode ocorrer em pacientes com sangue coagulável e com trombocitopenia e que a coagulopatia não é a causa primária da hemorragia.

13. LAPORTA-FERREIRA, I.L., SALOMÃO, M. da G.
Morphology, physiology and toxicology of the oral glands of a tropical Cochleophagous snake, *Sibynomorphus neuwiedi* (Colubridae-Dipsadinae).
Zool. Anz., v.*227*, n.3/4, p. 198-208, 1991.

Abstract: The present study examines some aspects of the oral glands of the dipsadine snake *Sibynomorphus neuwiedi*. Examination of the oral glands at both the light and electron microscopic levels reveals the presence of numerous secretory granules probably related to the production of venom. Experimental results on toxicity of extract from different glands are also presented. Histological analysis of the oral glands, the presence of serosal, mucosal and sero-mucosal cells are described. The electron microscopic analysis indicated the occurrence of a well developed rough endoplasmic reticulum and various types of electron dense granules in these cells. Myoepithelial cells were also seen but special attention is given to the *Duvernoy's* gland. Toxicity of the extracts of oral glands was demonstrated through inoculation in mice and snails. Injection of the fluid into the visceral

mass of snails resulted in paralysis and death some 4 to 24 hours later, while in mice it resulted only in paralysis during the first four hours and gradual recovery thereafter.

Resumo: O presente estudo examina alguns aspectos das glândulas orais da serpente dipsadínea *Sibynomorphus neuwiedi*. O exame das glândulas orais tanto ao microscópio óptico quanto eletrônico revela a presença de numerosos grânulos provavelmente relacionados à produção de veneno. Resultados experimentais sobre a toxicidade do extrato das diferentes glândulas são também apresentados. Análises histológicas das glândulas orais, a presença de células serosas, mucosas e seromucosas são descritas. As análises ao microscópio eletrônico indicaram a ocorrência de um retículo endoplasmático granular bem desenvolvido, e vários tipos de grânulos eletrodensos nestas células. Células mio-epiteliais foram também observadas, mas atenção especial foi dada à Glândula de Duvernoy. A toxicidade dos extratos das glândulas orais foi demonstrada através da inoculação em camundongos e caramujos. Injeções do fluido na massa visceral de caramujos resultou em paralisia e morte cerca de 4 a 24 horas depois, enquanto em camundongos resultou somente em paralisia durante as primeiras 24 horas, seguindo-se a recuperação gradual.

14. LUCCHIARI, M.A., MARTIN, J.P., MODOLELL, M., PEREIRA, C.A.
Acquired immunity of A/J mice to mouse hepatitis virus 3 infection: dependence on interferon-γ synthesis and macrophage sensitivity to interferon-γ.
J. Gen. Virol., v. *72*, *p.* 1317-1322, 1991.

Abstract: Coronavirus-free A/J mice (A/J-), in contrast to those naturally infected with coronavirus (A/J+), were shown to be susceptible to experimental infection with our strain of mouse hepatitis vírus 3 (MHV3). A/J-mice experimentally hyperimmunized with inactivated MHV3 (A/Ji) became resistant to challenge with this vírus. BALB/c mice free of (BALB/c-) or naturally infected with (BALB/c+) coronavirus, or hyperimmunized with inactivated MHV3 (BALB/ci), were always fully susceptible. All susceptible mice developed an acute hepatitis with a high vírus titre in the tissues. Resistance mice developed a mild disease in which the low vírus titres detected in the tissues were cleared. After infection, interferon (IFN)—γ synthesis in A/J-mice was lowere than that in A/J+and A/Ji mice; IFN—γ synthesis was very high in BALB/c+ and BALB/ci mice, but low in BALB/c- mice. Studies of the anti-MHV3 effect induced in macrophages *in vitro* showed that only IFN—γ activated A/J mouse macrophages were able to restrict partially the growth of MHV3, regardless of whether the animals had been immunized. The effect occurred only when the cells were activated with IFN—γ before virus infection. The results indicate that the resistance of A/J mice to our strain of MHV3 is not natural but is acquired after immunization, and that the mechanism involved is dependent on T cell activity, IFN—γ production and the sensitivity of macrophages to IFN—γ.

Resumo: Camundongos A/J livres de Coronavirus (A/J-), em contraste com aqueles naturalmente infectados com Coronavirus (A/J+, mostraram-se susceptíveis à infecção experimental com a nossa cepa de virus da hepatite murina 3 (MHV3). Camundongos A/J- experimentalmente hiperimunizados com MHV3 inativado (A/Ji) tornaram-se resistentes ao desafio com este virus. Camundongos BALB/c livres (BALB/c—) ou naturalmente infectados (BALB/c+) com Coronavirus, ou hiperimunizados com MHV3 inativados (BALB/ci), foram sempre totalmente susceptíveis. Todos os camundongos susceptíveis, desenvolveram uma hepatite aguda com altos títulos de virus nos tecidos. Camundongos resistentes desenvolveram uma doença leve e mostraram baixos títulos virais nos tecidos, que foram neutralizados. Após a infecção, a síntese de interferon (IFN) gama nos camundongos A/J- foi menor do que aquela em camundongos A/J+ e A/Ji; a síntese de IFN gama foi bastante alta em camundongos BALB/c+ e BALB/ci, mas baixa em camundongos BALB/c-. Estudos do efeito anti-MHV3 induzido em macrófagos "in vitro" mostrou que somente macrofagos de camundongos A/J ativados com IFN gama foram capazes de restringir parcialmente o crescimento dos MHV3, independentemente se os animais tinham sido imunizados ou não. O efeito ocorreu somente quando as células foram ativadas com IFN gama antes da infecção viral. Os resultados indicam que a resistência de camundongos A/J à nossa cepa do MHV3 não é natural, mas adquirida após imunização, e que o mecanismo envolvido é dependente de atividade de células T, produção de IFN gama e da sensibilidade de macrófagos ao IFN gama.

15. MANCINI, D.A.P., GERALDES, E.A., PINTO, J.R.
Titulo de anticorpos em cavalos imunizados com vacina contra influenza eqüina.
Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, *v.28*, n.2, p. 171-7, 1991.

Abstract: The immunogenicity of the bivalent equine influenza vaccines (types A/Eq_1 and A/Eq_2) plain, or adjuvanted with aluminum hydroxide, produced at the Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, was evaluated on horses sera taken before and after immunization by haemagglutination-inhibion (HI) and single radial haemolysis (SRH) tests. Seroconversion curves were estalished through weekly evaluations demonstrating good immunogenicity of both vaccines. Better humoral antibody titers were obtained with adjuvanted vaccine compared with the plain one, as showed by both methods used.

Resumo: Vacinas contra influenza eqüina bivalentes (A/Eq_1 e A/Eq_2) inativadas, sem e/ou com adjuvante de hidróxido de alumínio, produzidas no Instituto Butantan, foram comparadas quanto a sua capacidade de induzir a produção de anticorpos específicos, através dos testes de inibição da hemaglutinação (IH) e de hemólise radial simples (HRS), em dois lotes de potros. Pela análise de títulos de anticorpos no soro, a partir de avaliações semanais, verificou-se que ambos os tipos de vacina apresentam imunogenicidade. Ao prazo de um mês da vacinação observou-se que a imunização com vacina adicionada de adjuvante, comparada à imunização com vacina simples, resultou em respostas de anticorpos com títulos mais elevados tanto para IH como HRS, avaliadas frente às duas cepas virais.

16. MOURA-DA-SILVA, A.M., CARDOSO, D.F., TANIZAKI, M.M., MOTA, I.
Neutralization of myotoxic activity of *Bothrops* venoms by antisera to purified myotoxins and to crude venoms.
Toxicon, *v.29*, n.12, p. 1471-1480, 1991.

Abstract: A phospholipase myotoxin (MOO-1) and a non-phospholipase myotoxin (JSU-5) were studied for their antigenic cross-reactivity and neutralization by different antisera. Antisera against JSU-5 and MOO-1 reactedequally with both myotoxins in ELISA assays. The specificity of these antisera was also similar, recognizing the same 14,000-18,000 mol. wt components in the venoms of *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi* and *Bothrops pradoi*. Using creatine kinase assays, JSU-5, myotoxicity was completely neutralized by *B. jararacussu* antivenom or anti-JSU-5 antibodies and partially neutralized by *B. moojeni* antivenom or anti-MOO-1 antibodies. MOO-1 myotoxicity was completely neutralized by antisera against *JSU-5* and *MOO-1* and *B. jararacussu* antivenon, and only partially neutralized by *B. moojeni* antivenom. *B.jararacussu* venom induced high titres of antibodies against purified myotoxins. This antiserum completely inhibited the myotoxicity of the homologous venom and significantly reduced the myotoxicity of the remaining myotoxin-containing venoms. It is suggested that *B. jararacussu* venom is a good immunogen to induce antibodies against myotoxins present in the venoms of the different species of *Bothrops*.

Resumo: Uma miotoxina fosfolipásica (MOO-1) e uma miotoxina não fosfolipásica (JSU-5) foram investigadas quanto à reatividade antigênica cruzada e neutralização por diferentes antissoros. Antissoros contra JSU-5 e MOO-1 reagiram igualmente com ambas miotoxinas por ELISA. A especificidade destes antissoros foi também similar, ambos reconhecendo os mesmos componentes de 14000-18000 de peso molecular nos venenos de *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. pradoi*. Usando-se análises com creatino-quinase, a miotoxicidade da JSU-5 foi totalmente neutralizada pelo antiveneno de *B. jararacussu* ou por anticorpos anti JSU-5 e parcialmente neutralizada pelo antiveneno de *B. moojeni*. O veneno de *B. jararacussu* induziu elevados níveis de anticorpos contra as miotoxinas purificadas. Este antissoro inibiu completamente a miotoxicidade do veneno homólogo e reduziu significantemente a miotoxicidade dos outros venenos que continham miotoxina. Sugere-se que o veneno de *B. jararacussu* é um bom imunógeno para produzir anticorpos contra as miotoxinas presentes nas diferentes espécies de *Bothrops*.

17. MOURA-DA-SILVA, A.M., DESMOND, H., LAING, G., THEAKSTON, R.D.G.
Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes.
Toxicon, v.29, n. 6, p. 713-723, 1991.

Abstract. Venoms of nine different snake species of the genus *Bothrops* were fractionated using fast protein liquid chromatography (FPLC). Basic proteins with phospholipase A_2 and/or myotoxic activities were isolated from venoms of *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* and *B. pradoi*. *B. jararaca* venom possessed very low concentrations of these proteins, which were undetectable in venoms of *B. atrox*, *B. alternatus*, *B. cotiara* and *B. erythromelas*. Basic proteins from *B. moojeni* and *B. pradoi* venoms were isolated in pure form. All active fractions possessed a common band of 15,000 mol. wt which caused a rise in serum creatine phosphokinase levels and histopathological changes in muscle cells following i.m. injection into mice. Levels of phospholipase A_2 activity were variable. The implications of the possession of varying levels of myotoxins and phospholipase A_2 in these venoms are discussed.

Resumo: Os venenos de nove diferentes serpentes do gênero *Bothrops* foram fracionados por FPLC. Proteinas básicas com atividade de fosfolipase A_2 e/ou atividade miotóxica foram isoladas dos venenos de *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. pradoi*. O veneno de *B. jararaca* possui concentrações muito baixas dessas proteinas que foram indetectáveis nos venenos de *B. atrox*, *B. alternatus*, *B. cotiara* e *B. erythromelas*. As proteinas básicas da *B. moojeni* e *B. pradoi* foram isoladas e purificadas. Todas as frações ativas possuiam uma banda comum de 15000 de peso molecular capaz de provocar um aumento da creatino-fosfoquinase do soro e lesões histológicas das células musculares quando injetadas intramuscularmente em camundongos. As implicações da existência de níveis variáveis de miotoxina e de fosfolipase A_2 nestes venenos são discutidas.

18. PEREIRA, C.A., LUCCHIARI, M.A.
BCG redescoberto.
Nature, *v.351*, p.456, 1991.

Abstract: Due to its characteristics of a vaccine and specially to its properties of immunostimulation, the BCG is a strong candidate of a suitable agent for recombinant vaccines.

Resumo: Por suas características vacinais e sobretudo imunoestimuladoras, o BCG apresenta-se como forte candidato a constituir um agente completo para o preparo de vacinas recombinantes.

19. PREZOTO, B.C., HIRAICHI, E., ABDALLA, F.M.F., PICARELLI, Z.P.
Activation of the Kallikrein-Kinin system in plasma of some Brazilian snakes.
Comp. Biochem. Physiol., *v. 99C*, n.1/2, p.135-139, 1991.

Abstract: 1. Possible kallikrein-kinin system activation by ellagic acid, kaolin and glass beads was studied in plasma from five Brazilian snake species. 2. No generation of kinin-like substance(s) by these procedures was observed in assays carried out on snake isolated uterus. 3. However activity on synthetic chromogenic substrate for kallikrein was observed in *Waglerophis merremii* and *Crotalus durissus* but not in *Bothrops jararaca*, *Oxy-*

rophus trigeminus and *Bothrops moojeni* plasma. 4. This activity, presented by *Waglerophis merremii* and *Crotalus durissus* plasma, is *pH*, temperature and time dependent and possibly due to Hageman factor and prekallikrein since it is inhibited by hexadimethrine and trasylol.

Resumo: 1. A possível ativação do sistema calicreina-cininas por ácido elágico, caolin e pérolas de vidro foi estudada no plasma de cinco espécies de serpentes brasileiras. 2. Não se observou formação de substância(s) semelhante(s) a cininas, ensaida(s) em útero isolado de serpentes, por nenhum desses processos. 3. Todavia, foi observada atividade sobre o substrato cromogênico para calicreina nos plasmas de *Waglerophis merremii* e de *Crotalus durissus*, mas não nos de *Brothrops jararaca*, *Oxyrophus trigeminus* e *Bothrops moojeni*. 4. Essa atividade presente nos plasmas de *Waglerophis merremii* e *Crotalus durissus* é dependente de pH, temperatura e tempo e provavelmente relacionada ao fator de Hageman e à precalicreina, uma vez que é inibida por hexadimetrine e trasylol.

20. SÁNCHEZ, E.F., MAGALHÃES, A., MANDELBAUM, F.R., DINIZ, C.R.
Purification and characterization of the hemorrhagic factor II from the venom of the Bushmaster snake *Lachesis muta muta*.
Biochim. Biophys. Acta, v. 1074, p. 347-356, 1991.

Abstract: Hemorrhagic factor II (LHF-II) was isolated *Lachesis muta muta* (Bushmaster snake) venom using column chromatographies on Sephadex G-100, CM-Sepharose CL-6B and two cycles on Sephadex G-50. This preparation was devoid of phospholipase A_2 as well as of the enzymes active on arginine synthetic substrates (TAME and BAPNA) which are present in the crude venom. LHF-II was homogeneous by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Also, a single symmetrical boundary with a value of 2.59 S was obtained by ultracentrifugation. LHF-II contains 180 amino acid residues, has a molecular weight of 22300, and an isoelectric point of 6.6. It contains one gatom zinc and two gatoms calcium per mol protein. The hemorrhagic factor possesses proteolytic activity toward various substrates such as, casein, dimethylcasein, hide powder azure, fibrinogen and fibrin. It hydrolyzes selectively the A α-chain of fibrinogen, leaving the B β and γ -chains unaffected. LHF-II is activated by Ca^{2+} and inhibited by Zn^{2+}. The hemorrghagic as well as the proteinase activity is inhibited by cysteine and by metal chelators such as EDTA, EGTA and 1,10-phenanthroline. Inhibitors of serine proteinases such as phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and soybean trypsin inhibitor (SBTI) have no effect on the hemorrhagic factor.

Resumo: O fator henorrágico II (LHF-II) foi isolado do veneno de *Lachesis muta muta* (serpente Bushmaster) por cromatografias em colunas de Sphadex G-100, CM-Sepharose CL-6B e duas etapas de Sephadex G-50. Esta preparação apresentou-se livre de atividade fosfolipásica A_2 e de enzimas ativas sobre substratos sintéticos da arginina (TAME e BAPNA), presentes no veneno bruto. LHF-II mostrou ser homogêneo por eletroforese em SDS-gel de poliacrilamida, imunodifusão e imunoeletroforese. Por ultracentrifugação, apresentou um único pico simétrico de coeficiente de sedimentação de 2,59 S. LHF-II contém 180 resíduos de aminoácidos, seu peso molecular é 22.300 e seu ponto isoelétrico 6,6. A enzima contém um gátomo de zinco e dois de cálcio por mol de proteína. O fator hemorrágico possui atividade proteolítica sobre diversos substratos como caseína, dimetilcaseína, hidepower azure, fibrinogênio e fibrina. Hidrolisa seletivamente a cadeia Aα do fibrinogênio enquanto que as cadeias Bβ e γ permanecem intactas. LHF-II é ativada por Ca^{2+} e inibida por Zn^{2+}. A atividade hemorrágica e proteolítica são inibidas por cisteína e por metalocomplexantes como EDTA, EGTA e 1,10 fenantrolina. Inibidores de serino proteinases como PMSF e de tripsina (SBTI) não afetam o fator hemorrágico.

21. SANT'ANNA, O.A., BOUTHILLIER, Y., MEVEL, J.C., DE-FRANCO, M., MOUTON, D.
Isotypic distribution of antibody responses in lines of mice selected for high or low immunoresponsiveness.
Brazilian J. Med. Biol. Res., v. 24, p. 407-416, 1991.

Abstract: 1. The isotype distribution of antibody (Ab) responses to salmonella antigens (Ag) was investigated in high (H) and low (L), Ab responder lines of mice from Selections III and IV carried out for responsiveness to flagellar (f) and somatic (s) Ag, respectively. 2. Primary immunization resulted in higher Ab titers of all isotypes in response to both Ag in H mice from both selections and was confirmed after booster injections. The interline difference (H-L) in response to the distinct isotypes ranged from 3.0 to 7.0 $\log_2$ to Ag f in Selection III and from 2.0 to 5.1 $\log_2$ to Ag s in Selection IV. 3. Comparison of isotype production to 3 Ag in Selections I, II, III and IV demonstrated that: 1) the highest responses in all mice are those against the selection Ag, 2) the isotypic pattern depends on both the Ag injected and the host's genetic constitution, and 3) the presence or lack of a multispecific effect is not due to isotype-restricted regulation.

Resumo: A distribuição isotípica da resposta de anticorpos contra antígenos (Ag) de Salmonella foi investigada em linhagens de camundongos bons (H) e maus (L) produtores das Seleções III e IV, selecionadas, respectivamente, de acordo com a resposta a antígenos flagelares (f) e somáticos (s). A imunização primária induziu títulos mais elevados de anticorpos de todos os isótipos em resposta a ambos os antígenos nas linhagens H, fato confirmado após as injeções de reforço. A diferença interlinhagens (H-L) entre os títulos de anticorpos dos vários isótipos variou de 3.0 a 7.0 $\log_2$ para o antígeno f na Seleção III e de 2.0 a 5.1 $\log_2$ para o antígeno s na Seleção IV. A comparação das distribuições de isótipos na resposta contra 3 antígenos nas Seleções I, II, III e IV demonstrou que as maiores respostas em todos os camundongos são aquelas contra o antígeno de seleção; o padrão isotípico depende do antígeno e da constituição genética do hospedeiro e que a presença ou ausência do efeito multiespecífico não é devida à regulação restrita por isotipia.

COMISSÃO EDITORIAL. Coletânea de resumos de trabalhos publicados pelos pesquisadores do Instituto Butantan (1991). **Mem. Inst. Butantan**, v. **54**, n. 2, p. 69-81, 1992.

22. SPADACCI-MORENA, D.D., MATUSHIMA, E.R., MORENA, P., CIANCIARULLO, A.M., BRUNNER JR., A.
Ultrastructure of maturing fish (*Oreochromis niloticus*) and snake (*Waglerophis merremii*) erythroid cells with regard to hemoglobin biosynthesis.
Comp. Biochem. Physiol., *v. 100A*, n. 4, p. 949-955, 1991.

Abstract: Fish and snake immature erythrocytes were submitted to a comparative ultrastructural study, analysing changes in organelles involved in hemoglobin (Hb) biosynthesis. Iron uptake occurs probably via transferrin, and ferruginous compouns may accumulate as siderosomes, taken as iron sources for heme biosynthesis, later on caught by a double lamella. Mitochondrial membrane of the inner camera differentiates to lamellated bodies that, sucessively, give rise to expansions for ferruginous material and globin chains captation, constituting prehemosomal vesicles, which become condensed vesicles, followed by prohemosomes. Through an internal membrane rearrangement, prohemosomes change to hemosomes wherein, hypothetically, heme and the globin chains assembly may occur. In both fish and snake erythroid cells, all stages for hemosomegenesis are similar to the stages found in erythroid cells of other vertebrate species, including humans, except that fish cells often present single organelles of still unknown function, void of internal membrane. Through electrophoresis of the respective supernatants obtained after osmotical lysis of the organellar fractions, it was shown that fish hemosomes contain three Hb patterns, while snake hemosomes present two patterns.

Resumo: Eritrócitos imaturos de peixe e serpente foram submetidos a um estudo ultra-estrutural comparativo analisando modificações em organelos envolvidos na biossíntese de hemoglobina (Hb). A incorporação de ferro ocorre provavelmente via transferrina, podendo os compostos ferruginosos granulares constituir siderossomos, considerados fonte de ferro para a biossíntese de hemo; em seguida esse material é captado por uma lamela dupla A membrana mitocondrial da câmara interna diferencia-se em corpo lamelado. Os corpos lamelados dão origem, sucessivamente, a expansões para a captação do material ferruginoso e das cadeias globínicas, formando vesículas prehemossômicas que se modificam em vesículas condensadas, seguidas dos prohemossomos. Através de um rearranjo da membrana interna, os prohemossomos se transformam em hemossomos, nos quais, hipoteticamente, poderia ocorrer a combinação do hemo com as cadeias globínicas. Nas células eritróides tanto do peixe como da serpente, todas as fases para a hemossomogênese são semelhantes às fases encontradas nas células eritróides, de espécies de outros vertebrados, incluindo o homem, exceto que as células do peixe apresentam com freqüência organelos simples, de função ainda desconhecida, desprovidos de membrana interna. Através da eletroforese dos respectivos sobrenadantes obtidos da lise osmótica das frações organelares, foi evidenciado que os hemossomos do peixe contêm três formas de Hb, enquanto os hemossomos da serpente apresentam duas formas.

23. STOCCO DOS SANTOS, R.C., BARRETTO, O.C.O., NONOYAMA, K., CASTRO, N.H.C., FERRAZ, O.P., WALTER-MOURA, J., VESCIO, C.C.S., BEÇAK, W.
X-Linked Syndrome: mental retardation, hip luxation, and G6PD variant [Gd(+) Butantan].
Am. J. Med. Genet., *v. 39*, p. 133-136, 1991.

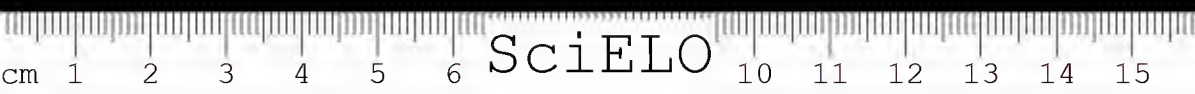
Abstract: An apparently new X-linked syndrome is presented. It occurred in four male first cousins. The main manifestations of this syndrome are severe mental retardation, bilateral congenital hip luxation, and short stature. Three of the affected males showed a new glucose-6-phosphate dehydrogenase variant.

Resumo: O presente estudo descreve uma nova síndrome genética ligada ao cromossomo X, encontrada em genealogia com quatro afetados, primos em 1º grau. As principais manifestações são retardo mental, luxação bilateral de quadril e baixa estatura. Em três dos afetados encontrou-se variante não descrita previamente de G6PD, possível marcador sindrômico.

24. SOARES, M.F.M., MOTA, I., MACEDO, M.S.
Suppression of the IgE antibody response by *Ascaris suum* components: effect of X-iradiation.
Brazilian J. Med. Biol. Res., *v.24*, p. 587-590, 1991.

*Abstract:*The effect of X-irradiation on the suppression of IgE antibody responses induced by some of the *Ascaris suum* (ASC) components was analyzed in mice (7-weeck old A/Sn females). Treatment with 300 R 24 h before immunization with 50μg OVA and 200 μg ASC suppressive components abolished the damping effect on anti-OVA IgE antibody levels. The same effect was observed on the anti-ASC IgE antibody response obtained in mice injected with 200 μg ASC immunogenic plus 200 μg ASC suppressive components. Moreover, the failure of suppressive components to induce an IgE anti-ASC antibody response on their own was also abolished by X-irradiation. These results indicate that the suppressive components are able to elicit an IgE antibody response, but simultaneously activate a regulatory mechanism which suppresses both the homologous (anti-ASC) and heterologous (anti-OVA) antibody formation.

Resumo: Estudou-se o efeito da radiação X sobre a supressão dos anticorpos IgE mediada por alguns componentes do *Ascaris suum* em camundongos. A aplicação de 300 R 24 h antes da imunização com ovalbumina e 200 μg do fator supressor do Ascaris aboliu o efeito supressor. Além disso, a falha do fator supressor em induzir a produção de anticorpors IgE contra ele mesmo, foi também abolida. Estes resultados indicam que os componentes supressores são capazes de induzir a produção de IgE e simultaneamente de ativar o mecanismo supressor que inibe a formação de anticorpos homólogos (anti-Ascaris) e heterólogos (anti-ovalbumina).

25. TANIZAKI, M.M., KAWASAKI, H., SUZUKI, K., MANDELBAUM, F.R.
Purification of a proteinase inhibitor from the plasma of *Bothrops jararaca* (jararaca)
Toxicon, *v.29*, n. 6, p. 673-681, 1991.

Abstract: A proteinase inhibitor was isolated from the plasma of *Bothrops jararaca* by three chromatographic steps: DEAE-Sephacel, Phenyl Sepharose and Bio Gel P_{-200}. It inhibited caseinolytic and hemorrhagic activity of the whole venom of *B. jararaca*. Proteolytic activity of bothropasin and J protease, both metalloproteinases of the venom, were neutralized by the inhibitor. The J protease-inhibitor complex was isolated by gel filtration chromatography lin HPLC and the electrophoresis pattern of this complex showed that the interaction between enzyme and inhibitor is not covalent.

Resumo: Um inibidor de proteinase foi isolado do plasma de *B. Jararaca* por três etapas cromatográficas: DEAE-Sephacel, Phenyl Sepharose e Bio Gel P_{-200}. Ele inibe as atividades caseionolítica e hemorrágica do veneno total de *B. jararaca*. A atividade proteolítica da bothropasina e J protease, metaloproteinases deste veneno, é neutralizada pelo inibidor. O complexo J protease-inibidor foi isolado por gel filtração no HPLC e o perfil eletroforético deste complexo mostrou que a interação enzima-inibidor não é covalente.

26. TRONCONE, L.R.P., TUFIK, S.
Effects of selective adrenoceptor agonists and antagonists on aggressive behavior elicited by apomorphine, DL-DOPA and Fusaric Acid in REM-Sleep-Deprived rats.
Physiol. Behav., v.50, p. 173-178, 1991.

Abstract: REM sleep deprivation (REMSD) results in behavioral changes such as the appearance of affective aggression induced by apomorphine (APO) and other dopaminergic agents. REMSD modifies dopamine-mediated behavior as well as the adrenergic receptor sensitivity. This paper evaluates the interaction between these two neurotransmission systems through changes in APO—, DL-DOPA — and fusaric acid (FA)-induced aggressive behavior in REMSD rats pretreated with phontolamine, propranolol, metaraminol, prazosin, clonidine, yohimbine, isoproterenol, butoxamine and maprotiline. Only isoproterenol reduced FA-induced aggressiveness. No specific changes in aggressiveness were noticed with other treatments and not even inhibitors of norepinephrine transmission induced aggressive behavior. It is concluded that norepinephrine had a slight inhibitory action on aggressiveness elicited by dopaminomimetic agents in REMSD rats. Beta-adrenoceptors could be responsible for this effect since only beta-selective drugs reduced aggression. As REMSD reduces beta-adrenoceptor sensitivity, only minor changes in aggressiveness could be observed. It was noted that the three drugs used to induce aggressive behavior elicited different patterns of aggression.

Resumo: Privação de sono REM (REMSD) causa mudanças de comportamento semelhantes àquelas que aparecem na agressividade induzida por apomormofina (APO) e outros agentes dopaminérgicos. (REMSD) modifica o comportamento mediado por dopamina como também a sensibilidade do receptor adrenérgico. Este trabalho avalia a interação entre esses dois sistemas neurotransmissores através da análise do comportamento agressivo induzido por APO-, DL-DOPA- e ácido fusárico (FA) em ratos REMSD pré-tratados com fentolamina, propanolol, metaraminol, prazosin, clonidina, yoimbina, isoproterenol, butoxamina e maprotilina. Somente o isoproterenol reduziu a agressividade induzida por FA. Não foram observadas modificações específicas na agressividade com os outros tratamentos e nem os inibidores da transmissão noradrenérgica induziram comportamento agressivo. Concluiu-se que a noradrenalina tem uma fraca ação inibidora sobre a agressividade causada por agentes dopaminomiméticos nos ratos REMSD. Adrenoreceptores beta poderiam ser responsáveis por esse efeito, uma vez que somente drogas seletivas para receptores beta reduzem a agressividade. Como REMSD reduz a sensibilidade de adrenoceptores beta, somente alterações mínimas na agressividade poderiam ser observadas. Observou-se que as três drogas usadas para induzir comportamento agressivo causaram padrões diferentes de agressividade.

27. VALENTINI, E.J.G., ALBAS, A., MENDES AUGUSTO, V.L., ITO, F.H.
Imunofluorescência realizada em cérebros de camundongos infectados com vírus rábico-cepa CVS, em diferentes estágios de decomposição.
Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, v.33, n.3, p.181-186, 1991.

Abstract: The efficiency of the fluorescent antibody (FA) test in detecting rabies virus antigen in decomposed spencimens was evaluated in simulated conditions of the safety test recommended for the assessment of residual virus in inactivated rabies vaccines. The CVS-infected mice were submitted to different treatments, combining time and temperature in order to cause different stages of carcass decomposition and, the FA test was carried out sequentially at pre-determined time intervals. For the materials stored at 25°C, greater difficulties for prompt recognition of the inclusion bodies were found after 12 - 18h whilst the specimens maintained at 4°C, the inclusions were easily visualized for up to 48h. Brain smears of carcasses kept at-20°C were suitable for adequate identification after 720h of storage. In carcasses that had been maintained at 25°C for 10h with additional storage at 4 or-20°C, rabies antigenicity could not be detected, respectively aftor 10 and 24 h, due to tissue decomposition. The authors recommend that the FA test, when applied as an additional tool for the control of the safety test of inactivated rabies vaccine using mice, care must be taken in order to avoid the use of decomposed materials.

Resumo: O teste de imunofluorescência (IF) foi avaliado na detecção de vírus rábico presente em cérebros de carcaças de camundongos infectados com vírus da cepa CVS, os quais foram conseguidos através de uma combinação de tratamentos, em que se variaram as temperaturas (4,25 e -20°C) e o tempo de armazenamento. No teste de IF realizado com impressões cerebrais de carcaças que haviam sido submetidas à temperatura de 25°C por 12-18 h, houve maior dificuldade de visualização imediata dos corpúsclos de inclusão, enquanto que nos materiais conservados a 4°C por até 48 h, as inclusões foram facilmente reconhecidas. Carcaças mantidas a -20°C mantiveram-se viáveis à identificação pela IF mesmo após terem sido armazenadas por 720 h quando

foram feitas as últimas observações. Em carcaças mantidas as 25°C por 10 h, com tratamento posterior a 4 e -20°C, o antígeno rábico não pode ser identificado através da IF, em conseqüência da decomposição das carcaças que ocorrem, respectivamente, após 10 e 24 h. Recomenda-se, portanto, empregar o teste de IF, em caráter de rotina, no controle de qualidade da vacina contra a Raiva, no que diz respeito à prova de vírus residual (teste de verificação da inativação viral), de vez que ele permite esclarecer mortes assintomáticas ocorridas em animais inoculados com a vacina, durante o período de observação da prova (21 dias), bem como evitar a sua repetição quando essas mortes ocorrem, o que representa considerável economia de tempo.

ÍNDICE DE AUTOR/AUTHOR INDEX

BOLETIM DE BIOTECNOLOGIA

VOLUME 3 — 1992 ISSN 0103-6548

Secretaria de Estado da Saúde
Coordenação dos Institutos de Pesquisa
Instituto Butantan

SUMÁRIO

Bol. Biotecnol., v. **3**, p. 11-23, 1992.

Bol. Biotecnol.
v. 3, p. 11-16, 1992

PURIFICAÇÃO INDUSTRIAL DO TOXÓIDE TETÂNICO POR GEL FILTRAÇÃO

Sally Muller Affonso PRADO**
Mary Dalva Caparroz VANCETTO**
Fernando FRATELLI**
Michel Marie PRAL**
José Marcos de OLIVEIRA**
Hisako Gondo HIGASHI*

RESUMO: Com o fracionamento pelo sulfato de amônio ou com a precipitação alcoólica, são obtidos toxóides tetânicos com pureza ao redor de 500 Lf/mg N.P. incompatíveis com as exigências da OMS, de 1000 a 1200 Lf/mg N.P. Foram descritas técnicas eficazes com a utilização da gel filtração em Sephadex G200, G100 e G75 que, no entanto, pela longa duração do processo, dificultam a produção em escala industrial. Introduzimos, assim, uma metodologia baseada na combinação da pré-precipitação pelo sulfato de amônio com a gel filtração em Sephadex G50 com a qual obtivemos toxóides tetânicos com grau médio reprodutivo de pureza ao redor de 2.312, 75 Lf/mg N.P. e resposta imunogênica satisfatória.

UNITERMOS: Purificação, toxina, toxóide tetânico, ultrafiltração, gel filtração, Sephadex

INTRODUÇÃO

De acordo com as Normas da Organização Mundial da Saúde (OMS)[9] as Anatoxinas Tetânicas (ATT), destinadas à produção de vacinas para uso humano, devem apresentar um grau de pureza igual ou maior do que 1000 Lf/mg N.P. . Os métodos de purificação geralmente utilizados pela maioria dos laboratórios produtores e que atendem às Normas da OMS, baseiam-se na possibilidade de fracionamento da ATT proporcionada pelo seu tratamento com o sulfato de amônio

* Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção do Instituto Butantan
** Seção de Vacinas Anaeróbicas do Instituto Butantan
Recebido para publicação em 31.01.92 e aceito em 24.06.92.

(SA)[6], seguido de diálise e concentração do produto por ultrafiltração molecular. A precipitação alcoólica da ATT foi também descrita[8] mas, além de não atingir o grau de pureza recomendado pela OMS necessita de equipamentos de custos elevados para a manutenção de temperatura a −5°C durante a maior parte do processamento.

Em países em desenvolvimento, como o Brasil, para o atendimento em bases econômicas aceitáveis quanto à quantidade requerida de vacina contra o tétano, a técnica de fracionamento da ATT pelo sulfato de amônio parece ser, ainda, a melhor opção. Ocorreram, todavia, com o tratamento da ATT pelo sulfato de amônio seguido de ultrafiltração, de acordo com a metodologia empregada no Instituto Butantan (IB), os seguintes problemas: médias baixas de valores de pureza situando-se em 428,40 Lf/mg de N—protéico; dispêndio elevado de tempo na fase de ultrafiltração e produto final de coloração fortemente acastanhada e persistente revelando comprometimento da sua pureza.

Através de técnicas cromatográficas Latham e cols.[4], empregando o gel de Sephadex conseguiram separar as proteínas específicas daquelas impurezas responsáveis pela coloração acastanhada do produto. Este mesmo grupo, posteriormente, descreve o método combinado de fracionamento da ATT pelo sulfato de amônio e purificação por cromatografia em géis de Sephadex G100 e G200[5]. Com esta técnica é possível obter ATT com 1000 ou mais Lf/mg N protéico.

Em que pese a obtenção de ATT de elevado grau de pureza pela técnica acima mencionada, a sua aplicabilidade em escala industrial era limitada pelo custo elevado das colunas de Sephadex, além de lentidão no processamento.

Em seqüência às observações de Latham e cols.[5], os autores, estabeleceram os objetivos deste trabalho que consistiram, essencialmente, na obtenção de ATT com grau de pureza compatível com as Normas da OMS, num período de tempo de processamento cromatográfico menor e a custo relativamente mais baixo.

Para atingir os objetivos propostos foi aplicado o método de fracionamento pelo S.A. em anatoxina bruta, previamente concentrada e, em seguida a diálise, o produto foi submetido ao processamento cromatográfico em coluna de Sephadex G50.

MATERIAIS E MÉTODOS

Toxina Tetânica (TT):

Lotes de 360 litros obtidos por processo fermentativo[1,2] utilizando a cepa de *Cl tetani* Harvard-Caracas, desenvolvida em meio de Müeller modificado por Latham[3].

Anatoxina Tetânica (ATT):

Obtidas pela atividade destoxificante de 6‰ V/V de formalina, durante 30 dias a 37°C, sobre as TT previamente concentradas 6 a 10 vezes por ultrafiltração e esterilizadas por filtração através de cartuchos de 0,22u.

Testes realizados[9]:

TT —
- L+ (Limite Morte)
- MTV (Máximo Valor de Toxina)
- DMM (Dose Mínima Mortal — Camundongos)
- Teor de Nitrogênio protéico
- Limite floculante

ATT —
- Toxicidade específica
- Atividade antigênica
- Teor de Nitrogênio protéico
- Limite floculante
- Formaldeído residual

Parâmetros mínimos aceitáveis para as TT e ATT

TT — Estar estéril e ter título ''in vitro'' de pelo menos 25Lf/ml.
ATT — Ser atóxica e ter no mínimo 15Lf/ml.

Purificação das ATT

Fase 1 — Concentração por equipamento de Ultrafiltração (Millipore 10.000 D) até redução de 6 — 10 vezes em relação ao volume inicial.

Fase 2 — Precipitação por 33% p/v de sulfato de amônio P.A., pH de 5,0 a 6,0 à temperatura ambiente com agitação limite a 100 rpm. O produto é mantido sob agitação até a dissolução total do sulfato e a seguir distribuído nos frascos para centrifugar.

Fase 3 — Centrifugações
a) para recolhimento do precipitado de ATT: a 5.000 rpm, 20 minutos a 0°C em centrífuga Beckman J2-21. O precipitado foi ressuspenso em água destilada em quantidade suficiente para dissolução da precipitação;
b) para eliminação de impurezas insolúveis: após dissolução do precipitado o material foi novamente centrifugado no mesmo equipamento, a 8.000 rpm, 90 minutos a 0°C.

Fase 4 — Diálise e Concentração — dialisado em ultrafiltro (Millipore, membrana 10.000 D) até a eliminação do sulfato de amônio, (teste com solução de cloreto de bário). No mesmo equipamento a ATT é concentrada 6 a 10 vezes.

Fase 5 — Processamento cromatográfico — Uma coluna de vidro de 58 cm de comprimento x 7,5 cm de diâmetro interno foi empacotada com Sephadex G50 tipo médio e equilibrada a pH 6,8 com solução salina tamponada (NaCl: 0,68g; Na_2HPO_4: 0,105g; KH_2PO_4: 0,081g; H_2O dest. qsp 100ml), como segue: 2.700ml de gel foram colocados gradualmente na coluna para que as partículas do Sephadex sedimentassem-se por gravidade. Volume de 900ml de ATT foi aplicado, controlando-se a separação de todas as frações por precipitação com ácido tricloroacético a 20%. De cada fração obtida determinou-se o Lf e aquelas que apresentaram Lf igual ou maior do que 50Lf/ml foram reunidas, acrescentando 0,02% P/V de timerosal como preservativo e o pH corrigido entre 6,0 a 7,0.

Fase 6 — Esterilização, armazenamento e testes da ATT purificada e concentrada — a esterilização foi efetuada por filtração em membrana inerte de 0,22u (Millipore) e o produto armazenado em frascos de vidro a 4°C. De cada lote de produto purificado foram extraídas amostras para as provas Físico-Químicas, Biológicas e Imunoquímicas segundo recomendações da OMS[9].

Reutilização da coluna — o gel de Sephadex foi lavado com 10.000 ml de água destilada e ressuspenso em 6.000 ml de água destilada adicionada de 0,02% P/V de azida sódica e a coluna armazenada a 4°C.

PRADO, S.M.A., VANCETTO, M.D.C., FRATELLI, F., PRAL, M.M., OLIVEIRA, J.M., HIGASHI, H.G. Purificação industrial do toxóide tetânico por gel filtração. Bol. Biotecnol., v. 3, p. 11-16 , 1992.

Gráf. 1 Comparação da purificação de Anatoxina purificada com a Anatoxina bruta e precipitado com sulfato de amônio.

TABELA 1

Média de pureza antes e após o tratamento cromatográfico e de rendimento.

Nº de lotes de ATT Purificados	Pureza-Lf/mg NP* Cromatografia		Rendimento %
	Antes	Após	
21	881,58	2.312,75	82,63

* NP — Nitrogênio protéico

Os graus de pureza mínimo e máximo observados foram 1.148,15 Lf/mg NP e 5.800 Lf/mg NP, respectivamente.

A atividade imunogênica dos produtos finais diluídos para conter 15Lf/ml foi entre 3UI a 4UI/ml.

Com os equipamentos descritos a purificação de um lote de 45 litros de ATT, compreendendo desde a Fase 1 até a Fase 5, pode ser obtida em 4 dias, empregando como mão-de-obra 2 funcionários.

DISCUSSÃO

Na produção de Toxóide Tetânico ou para o seu uso nas vacinas combinadas este componente deve ser purificado — bem como os outros da vacina combinada — para minimizar os riscos de efeitos colaterais. Os toxóides considerados

de 1ª geração eram grosseiramente purificados e, geralmente, por precipitações pelo sulfato de amônio[8]. Os produtos assim obtidos continuavam demonstrando propriedades alergênicas devido à presença de antígenos dispensáveis. Estes antígenos acessórios também sobrecarregam desnecessariamente o sistema imunitário do receptor. Para a obtenção de toxóides de 2ª geração vêm sendo aplicadas técnicas cromatográficas de purificação às TT ou ATT, segundo preferência dos diferentes produtores. Com estes toxóides a atividade alergizante é diminuta e os mesmos apresentam atividade imunogênica elevada que permite, inclusive, a redução de volume de anatoxina a ser aplicada para a profilaxia.

As técnicas cromatográficas propostas por Latham e cols.[4,5], que utilizam o Sephadex G200, G100 e G75, foram experimentadas pelos autores no Instituto Butantan, com as quais obtiveram resultados amplamente satisfatórios quanto ao grau de pureza. No entanto, em nossas condições de trabalho, essas técnicas não puderam ser conciliadas com os volumes relativamente grandes de ATT a serem tratados. Com colunas do tipo simples, cujo fluxo de passagem do material ocorre por gravidade, o tempo dispendido para a coleta das frações foi demasiadamente longo. Constatada esta limitação, os autores resolveram introduzir o sistema de filtração em gel de Sephadex G50, conforme a técnica descrita, através da qual prepararam 2.654.933 doses de Vacina Antitetânica, com um rendimento médio de recuperação de anatoxina igual a 82,63%. O grau médio de pureza obtido foi de 2.312,75Lf/mg NP, praticamente duas vezes superior ao mínimo preconizado pela OMS[9]. As provas de potência realizadas nos lotes purificados demonstraram resultados iguais ou superiores de 3UI/ml no soro de cobaias inoculadas com 1/3 da dose total humana, de acordo com os requisitos[7] descritos para o produto. O período de tempo consumido para a purificação cromatográfica foi 3 vezes inferior àquele gasto pela técnica de Latham. A reprodutibilidade dos resultados aliada ao custo operacional mais baixo do que o da técnica de Latham e cols., nos autoriza sugerir o método descrito para a purificação do Toxóide Tetânico.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Darío Pinto de Miranda pelas sugestões e assessoria na parte técnica, ao Dr. Rosalvo Guidolin pelas sugestões e revisão do trabalho e à Dra. Ivone K. Yamaguchi pelo auxílio técnico prestado durante a execução do trabalho relativo às reações imunoquímicas.

ABSTRACT: In using the process of fractionation by ammonium sulfate or by alcohol pre-precipitation, it is possible to obtain tetanic toxoids that contain a purity level of approximately 500Lf/mg N.P., incompatible to the requirements of OMS of 1,000 to 1,200Lf/mg N.P. Descriptions of efficient techniques which utilize gel filtration-in Sephadex G200, G100 and G75 — have been made; however, due to the prolonged duration of this process, its use for industrial production is unadvisable. Therefore, we have introduced a methodology based on the combination of pre-precipitation with ammonium sulfate and gel filtration in Sephadex G50 from which we have obtained tetanic toxoids containing an average level of purity reproduction of about 2,312.75Lf/mg N.P. and presenting satisfactory immunologic response.

KEYWORDS: Purification, toxins, tetanus toxoids, ultrafiltration, gel filtration, Sephadex.

PRADO, S.M.A., VANCETTO, M.D.C., FRATELLI, F., PRAL, M.M., OLIVEIRA, J.M., HIGASHI, H.G. Purificação industrial do toxóide tetânico por gel filtração. **Bol. Biotecnol.**, v. 3, p. 11-16 , 1992.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HERMET, P. Van. Vaccine production as a unit process. *Prog. Ind. Microbiol.*, v. **13**, p. 248-260, 1974.
2. HERMET, P. Preparation of purified: tetanus toxoid. In: *Instructions for the preparation of bacterial and viral vaccines*. Bilthoven: Rijks Inst. Voor de Volksgezondheid, 1979. p. 601-615.
3. LATHAM, W.C., BENT, D.F., LEVINE, L. Tetanus toxin production in the absence of protein. *Appl. Microbiol.*, v. **10**, p. 146-152, 1962.
4. LATHAM, W.C., JENNESS, C.P., TIMPERI, R.J.K. Purification and characterization of tetanus toxoids and toxin: fractionation of tetanus toxoid by gel filtration. *J. Immunol.*, v. **95**, p. 487-493, 1965.
5. LATHAM, W.C., MICHELSEN, C.B., EDSALL, G. Preparative procedure for the purification of toxoids by gel filtration. *Appl. Microbiol.*, v. **15**, p. 616-621, 1967.
6. LEVINE, L., STONE, J.L. The purification of tetanus toxoid by ammonium sulfate fractionation. *J. Immunol.*, v. **67**, p. 235-241, 1951.
7. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Division of Biologics Standars. *Minimum requirements:* tetanus toxoide. 4. rev. Bethesda, Md, 1952.
8. PILLEMER, L., GROSSIBERG, D.B., WITTLER, R.G. The immunochemistry of toxins and toxoids — The preparation and immunologic evaluation of purified tetanus toxoid. *J. Immunol.*, v. **54**, p. 213-224, 1946.
9. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Manual for the production and control of vaccines:* tetanus toxoid./s.l.p./, WHO, 1977.

Bol. Biotecnol.
v. 3, p. 17-23, 1992

PRODUÇÃO DE PLASMA ANTITETÂNICO HIPERIMUNE, DE ORIGEM EQÜINA

Rosalvo GUIDOLIN*
Celso Pereira CARICATI**
Sally Muller Affonso PRADO***
Mary Dalva Caparroz VANCETTO***
Fernando FRATELLI***
Amélia Keiko NISHIKAWA****
Hisako Gondo HIGASHI*

RESUMO: Com 10 cavalos doados pela Polícia Militar do Estado de São Paulo, previamente vacinados contra o tétano, demonstra-se aplicabilidade de um teste para seleção de animais produtores de plasma antitetânico de títulos elevados. É discutida, também, a vantagem do uso de animais previamente vacinados contra o tétano, quanto ao aspecto econômico na produção do soro antitetânico, uma vez que podem alcançar, na imunização básica e na primeira reimunização, títulos antitóxicos superiores, em média, a 10 vezes em relação aos animais não previamente vacinados.

UNITERMOS: Plasma antitetânico, hiperimunização, seleção de cavalos.

INTRODUÇÃO

O soro antitetânico hiperimune, usado na profilaxia e no tratamento do tétano humano e animal, é geralmente obtido de eqüino hiperimunizado, cujo plasma é tratado com pepsina e purificado por desnaturação pelo calor e precipitação por sulfato de amônio[1,3,5]

O alto custo, tanto do cavalo como o da sua manutenção, estimula à pesquisa de esquemas de hiperimunização que visam títulos elevados de anticorpos espe-

---

* Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção do Instituto Butantan
** Seção de Obtenção de Plasmas Hiperimunes
*** Seção de Vacinas Anaeróbicas
**** Seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes

Recebido para publicação em 22.5.92 e aceito em 05.11.92.

cíficos nesses animais a partir da imunização básica (primeira hipermunização). Para atingir esta condição, não basta apenas a aplicação de determinado tipo de esquema, pois verifica-se, sempre, que em qualquer esquema aplicado, ao redor de 40% dos animais submetidos, não respondem com títulos satisfatórios. Faz-se, assim, necessário o uso de outra medida como seja: a seleção de bons animais produtores, de preferência entre aqueles previamente vacinados contra o tétano.

No presente trabalho será relatado um sistema de seleção capaz de proporcionar, a curto prazo, plantel de animais relativamente homogêneo quanto aos títulos de anticorpos tetânicos, com dados obtidos entre 10 cavalos testados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais — cavalos doados pela Polícia Militar (PM) do Estado de São Paulo, com peso e idade médias de 370 quilos e 14 anos, respectivamente. Todos os animais foram vacinados contra o tétano quando prestavam serviços na Polícia Militar. Os animais foram marcados no Instituto Butantan como segue: 906, 910, 918, 936, 958, 961, 973, 991, 998 e 999.

Imunização seletiva: todos os animais receberam, por via intramuscular (IM), uma dose de 20 ml de anatoxina tetânica purificada[6], contendo 100Lf/ml e adsorvida ao fosfato de alumínio (1mg de Al. por ml de anatoxina).

No 11º dia após a aplicação da vacina foram extraídos 40ml de sangue da veia jugular de cada cavalo e, após coagulação do sangue e separação do soro a 4ºC, os soros foram individualmente testados quanto à concentração de anticorpos tetânicos.

Adjuvante: foi utilizado o adjuvante oleoso, emulsão múltipla, preparado segundo Herbert[4].

Hiperimunização básica ou primeira imunização: desenvolvida por aplicação das doses por via IM segundo o esquema abaixo:

Fase 1

Antígeno = Anatoxina purificada titulando 20Lf/ml				
Dia	Volume Antígeno (ml)	Total de Lf*	Adjuvante (ml)	Testes
1	5	100	5	—
2	10	200	—	—
4	15	300	—	—
6	20	400	—	Sangria de prova

* Lf (limite floculante) — é a quantidade de toxina que exibe floculação inicial com 1 U.I. de antitoxina.

Fase 2

Antígeno = Anatoxina purificada titulando 40Lf/ml				
Dia	Volume Antígeno (ml)	Total de Lf	Adjuvante (ml)	Testes
8	20	800	—	—
10	30	1200	—	—

Fase 3

Antígeno = Anatoxina purificada titulando 100Lf/ml				
Dia	Volume Antígeno (ml)	Total de Lf	Adjuvante (ml)	Testes
12	16	1600	15	—

Fase 4

Antígeno = Toxina purificada titulando 100Lf/ml				
Dia	Volume Antígeno (ml)	Total de Lf	Adjuvante (ml)	Testes
14	24	2400	—	—

Fase 5

Antígeno = Toxina purificada titulando 200Lf/ml				
Dia	Volume Antígeno (ml)	Total de Lf	Adjuvante (ml)	Testes
17	16	3200	—	—
20	20	4000	—	—
24	25	5000	—	Sangria de prova

Sangrias para produção — Foram extraídos por punção da jugular, 6 litros de sangue de cada animal por sangria e aplicado o sistema de plasmaferese, segundo o quadro abaixo:

Dia	Sangria nº	Plasmaferese
31	1	—
33	2	Aplicada
35	3	Aplicada

Recebimento do sangue, separação do plasma e plasmaferese — O sangue foi colhido em bolsas plásticas duplas e interligadas, com capacidade para 6 litros, das quais a 1ª bolsa continha 400ml de solução anticoagulante (1,47% de dextrose, 4,8% de citrato de sódio e 1,47% de ácido cítrico). As bolsas foram esterilizadas pelo fabricante* por radiação gama de cobalto. Imediatamente após a coleta, as bolsas foram armazenadas em câmara a 4°C e o plasma foi transferido, 24 horas após, para a segunda bolsa. As hemácias que permaneceram na bolsa nº 1 foram ressuspensas com 1000ml de solução salina a 0,85% NaCl esterelizada a 121°C/30 minutos e a suspensão foi reinoculada pela veia julgular, no mesmo animal doador. A reinfusão das hemácias foi completada em aproximadamente 20 minutos.

Reimunização dos cavalos — Após um período de recuperação de 30 dias, contados a partir da última sangria, os animais foram reimunizados por via IM, como segue:

Antígeno = Anatoxina purificada titulando 200Lf/ml				
Dia	Volume Antígeno (ml)	Total de Lf	Adjuvante (ml)	Testes
1	5	1000	5	—
7	5	1000	—	—
10	15	3000	—	Sangria de prova

Os volumes de sangue, separação do plasma e plasmaferese foram conduzidos como descritos para a hiperimunização básica.

Testes — A atividade antitóxica foi ensaiada segundo o método estabelecido pelo US National Institutes of Health[5].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1, encontram-se os resultados das atividades neutralizantes do soro de cada cavalo testado, segundo o esquema de hiperimunização descrito, após as fases de: imunização seletiva; Fase 1, Fase 5 e reimunização.

* JR Indústria e Comércio de Produtos Hospitalares — Campinas — S.P.

GUIDOLIN, R., CARICATI, C.P., PRADO, S.M.A., VANCETTO, M.D.C., FRATELLI, F., NISHIKAWA, A.K., HIGASHI, H.G. Produção de plasma antitetânico hiperimune, de origem eqüina. **Bol. Biotecnol.**, v. **3**, p. 17-23, 1992.

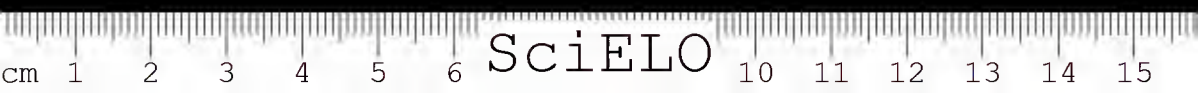



Tabela 1

Atividade neutralizante individual, expressa em unidades internacionais (U.I.) por ml, determinadas após o término das fases seletivas 1, 5 e de reimunização.

CAVALO Nº	IMUNIZAÇÃO SELETIVA	FASE 1	FASE 5	REIMUNIZAÇÃO
906	> 9,0	55,0	200	200
910	< 1,0	< 27,0	NT	60
918	> 9,0	84	> 500	+
936	> 9,0	84	> 500	2.100
958	> 9,0	84	180	1.250
961	> 9,0	55	> 500	+
973	> 9,0	180	> 550	2.000
991	> 9,0	84	450	1.180
998	> 9,0	84	530	600
999	< 9,0	84	NT	200

NT — Não testado
\+ — Morreu

Verifica-se, claramente, que — nas condições da experiência — atingiram títulos elevados os cavalos que apresentaram atividade soro-neutralizante da toxina tetânica, na fase de imunização seletiva, superior a 9,0 U.I./ml. A finalidade básica do teste seletivo é a de selecionar precocemente os animais para atingir rendimentos satisfatórios em número de unidades circulantes no plasma a partir da hiperimunização básica e primeira reimunização. Um grupo de 40 cavalos não previamente vacinados contra o tétano, destinado à produção normal de soro antitetânico, submetido ao mesmo esquema de hiperimunização e testado na mesma fase (1ª reimunização) dos experimentais, apresentou título antitóxico médio igual a 600 U.I./ml de soro.

Ressalta-se que o custo de manutenção dos cavalos é relativamente alto, estimado atualmente ao redor de Cr$ 25.000,00 por dia e o tempo decorrido desde o início da hiperimunização básica até o final da primeira reimunização é de aproximadamente 100 dias. Nesse período, segundo a nossa experiência (Tab. 1), pelo menos três entre 10 animais não apresentaram títulos antitóxicos recomendáveis para que fossem sangrados e, conseqüentemente, os seus soros não seriam aproveitados.

As nossas observações (não publicadas), acumuladas em 40 anos de vivência sobre o assunto, relativas a muitas centenas de animais hiperimunizados, nos autorizam a informar que cavalos com títulos relativamente baixos, 300 ou 400

U.I./ml, após a primeira reimunização, têm probabilidades de atingir títulos ao redor de 1.000 a 1.200 U.I./ml na 3ª ou 4ª reimunização. Isto representa aproximadamente mais 90 dias de trabalho que, acrescidos aos 100 dias mencionados, atinge a meio ano deficitário para 30 ou 40% dos animais.

As anatoxinas tetânicas muito potentes, aplicadas de acordo com a dose recomendada para a imunização seletiva, em cavalos não previamente vacinados contra o tétano, podem induzir, em alguns animais, títulos iguais ou superiores às nove unidades internacionais requeridas para a seleção (Dr. Petenella — Sclavo — Comunicação Pessoal — 1981). Ocorre, todavia, que antígenos assim qualificados, não encontram-se facilmente disponíveis nos laboratórios produtores brasileiros.

Nestas condições, a alternativa possível é a de estimular junto aos fornecedores de cavalos a vacinação contra o tétano de animais jovens (seis a 12 meses de idade) os quais, ao redor dos quatro anos de idade, poderão ser selecionados para a produção de plasma antitetânico hiperimune. Neste particular, no decorrer da década de 1930, diversos autores [2,8,9] demonstraram a vantagem da utilização de cavalos previamente vacinados contra o tétano, há, pelo menos, seis meses antes do início da hiperimunização antitetânica, no que diz respeito aos títulos antitóxicos alcançados. Relatam esses autores que, títulos de até 100 vezes maiores, podem ser obtidos em relação aos animais não previamente vacinados.

Recentemente em nosso laboratório, verificamos que a inoculação de 20ml de anatoxina purificada, com 100Lf/ml, em 48 cavalos com em média, 400 quilos de peso e quatro anos de idade, não previamente vacinados contra o tétano, não induziu a títulos superiores a uma U.I./ml no 11º dia após à aplicação, (imunização seletiva) em 10 animais apanhados ao acaso (dados não publicados). Assim, o teste de seleção, nestas condições, é inconclusivo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Major PM Rui Cesar Melo, Comandante Interino do Regimento ''9 de Julho'' pela doação dos cavalos.

ABSTRACTS: In 10 horses granted by Military Police of São Paulo State, previously vaccinated against tetanus, the application of a test in order to have selectioned animals of high tetanus antibodies titre in the plasma production is demonstrated. Also the advantage to use previously antitetanus vaccinated animals is discussed regard to the economical aspect in antitetanus production because these animals are able in the basic immunization ad first reimunization to reach an antitoxic titres 10 times (average) higher than the non previously vaccinated animals.

KEYWORDS: Antitetanus plasma, hiperimmunization, horse selection.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, C.G. The distribution of diphteria antitoxin in pepsin-digested horse antiserum. *Biochem. J.*, v. **59**, p. 47-52, 1955.
2. DESCOMBEY, P. Sur une technique de production de l'antitoxine tétanique et ses résults. *Ann. Inst. Pasteur*, v. **45**, p. 373-375, 1930.

GUIDOLIN, R., CARICATI, C.P., PRADO, S.M.A., VANCETTO, M.D.C., FRATELLI, F., NISHIKAWA, A.K., HIGASHI, H.G. Produção de plasma antitetânico hiperimune, de origem eqüina. **Bol. Biotecnol.**, v. **3**, p. 17-23, 1992.

3. HARMS, A.K.J. Purification of antitoxin plasma by enzyme treatment and heat denaturation. *Biochem. J.*, v. **42**, p. 390-397, 1948.
4. HERBERT, W. J. Multiple emulsions: a new form of mineral — oil antigen adjuvant. *Lancet*, v. **16**, p. 771, 1965.
5. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. *Minimum requeriments:* tetanus toxin, 4. rev. Washington: U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1952.
6. POPE, C.G. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. I. True digestion of the protein. *Brit. J. exp. Pathol.*, v. **20**, p. 132-149, 1939.
7. PRADO, S.M.A., VANCETTO, M.D.C., FRATELLI, F., PRAL, M.M., OLIVEIRA, J.M., HIGASHI, H.G. Purificação industrial do toxóide tetânico por gel filtração. *Bol. Biotecnol.*, v. **3**, p. 11, 1992.
8. RAMON, G., DESCOMBEY, P., LEMÉTAYER, E. Sur l'immunisation antitoxique active et sur la production intensive de l'antitoxine tétanique chez cheval. *Ann. Inst. Pasteur*, v. **46**, p. 444-456, 1931.
9. RAMON, G., LEMÉTAYER, E., MUSTAFA, A. Sur une méthode de production rapide et intensive de l'antitoxine tétanique. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, v. **124**, p. 895-898, 1937.

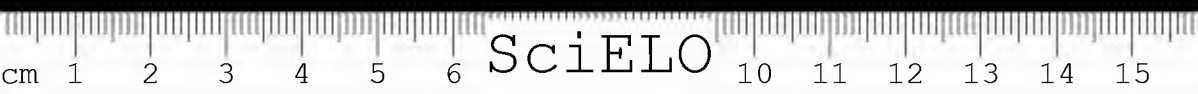
Mem. Inst. Butantan
v. 54, n. 2, 1992

MINI-SIMPÓSIO

SISTEMA COMPLEMENTO: pesquisas de interface

Organizador: Prof. Dr. Wilmar Dias da Silva

Local: Auditório da Biblioteca
Instituto Butantan

Data: 05 de novembro de 1992

MINI-SIMPÓSIO
SISTEMA COMPLEMENTO: pesquisas de interface.

Data: 05 de novembro de 1992
Local: Auditório da Biblioteca — Instituto Butantan

14:00 h. — ''Role of complement in *Trypanosoma cruzi* bloodstream trypomastigotes clearance''.
Lilia F. Umekita
Laboratório de Imunopatologia — Instituto Butantan.

14:30 h. — ''Manipulation of the complement system by microorganisms and man''.
Michael Kirschfink
Institut füer Immunologie — Universitaet Heidelberg — Germany.

15:00 h. — ''Primary complement deficiencies''.
Anete Sevciovic Grumach
Unidade de Imunopatologia, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina — USP.

15:30 h. — ''Manipulation of the complement system by animal venoms''.
Denise Vilarinho Tambourgi e Ana Cláudia Mello Rocha Campos.
Departamento de Imunologia — Instituto de Ciências Biomédicas
Laboratório de Imunoquímica, Instituto Butantan.

16:00 h. — ''The role of complement in the pathogenesis of HIV infection''.
Michel D. Kazatchkine
Unité d'Immunopathologie — Hôpital Broussais-Paris, França.

16:10 h. — General discussion.

OPENING REMARKS

The organization of this small meeting on ''The Complement (C) System: the interface research'' was made possible by the fortunate concurrence of several happenings: a) the joining in São Paulo, at the same time, of two internationally recognized complementologists, Dr. Michel D. Kazatchkine, Unité d'Immunobiologie, Hôpital Broussais, Paris, France, and Dr. Michael Kirschfink, Institut füer Immunologie, Universität Heidelberg, Germany. The first, presently is performing exciting work on the role of C in enhancing infection of target cells with human HIV, while the second is deeply involved in the manipulation of C system by microorganisms and man; b) the simultaneous emergence in laboratories of the ''Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo'' and ''Instituto Butantan'', of interesting results related respectively, with the clearance of the trypomastigote forms from the blood of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and the expression of some C activities after treatment of human normal serum with snake or spider venoms; c) the recent establishment at the ''Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo'', of a laboratory specifically devoted to analyze the participation of individual components of C system in human diseases; and, d) maybe the most important, the enthusiastic acceptance by all invited speakers to attend, at the last hour, our invitation to participate of this meeting. Needless-to-say, the meeting was enjoyable and profitable, since it provided an opportunity to bring up-to-date informations concerned with the topics developed by the speakers.

The organizer warmly thanks the Editors of ''Memórias do Instituto Butantan'' for publishing the conferences, the Instituto Butantan employees directly or indirectly involved in the meeting organization and the ''Laboratório Sandoz do Brasil'' for the generous support.

Mem. Inst. Butantan, v. **54**, n. 2, 1992.

ROLE OF COMPLEMENT IN *Trypanosoma cruzi* BLOODSTREAM TRYPOMASTIGOTES CLEARANCE

Lilia Fujimura Umekita
Laboratório de Imunopatologia — Instituto Butantan — São Paulo

Participation of antibodies in resistance against *Trypanosoma cruzi* has been clearly demonstrated by protection after passive transfer of immune serum or its IgG fraction.

Evidence was also provided that these antibodies are necessary for the clearance of parasites from the blood.

In this communication we report results of experiments trying to explain the mechanism of clearance of bloodstream trypomastigotes of *T. cruzi* (Btrys) in mice.

Passive transfer of immune serum or its IgG fraction (obtained from mice chronically infected with *T. cruzi*) to mice containing circulating Btrys, induced a very fast clearance of the parasites that was similar in normocomplementemic and C_5 deficient mice.

IgG fraction obtained from immune serum was very efficient in inducing complement mediated lysis and immune clearance of Btrys whereas its $F(ab')_2$ fragments although able to induce lysis were unable to induce clearance. These results prompt us to suggest that the immune clearance of Btrys is dependent on the antibody Fc region.

Experiments with mice depleted of C_3 by treatment with CVF, showed that the immune clearance of Btrys induced by anti-*T. cruzi* antibodies was completely abolished in the absence of C_3 suggesting that this component is required for the removal of Btrys from circulation.

In vitro experiments with whole blood or its fractions showed that the platelets were able to induce lysis of Btrys in presence of antibody and complement. A significant diminution in the number of circulating platelets was observed during the clearance of Btrys. Furthermore, removal of platelets from the peripheral blood by treatment with anti-platelet IgG antibodies resulted in a significant diminution in the Btrys clearance. However, the interpretation of this result is complicated by a simultaneous reduction in the complement system due to formation of Ag-Ab complexes (platelet-anti platelet).

Anyway, these results suggest that complement and platelets may be involved in the removal of the Btrys from circulation and may have an important role in the physiopathology of *T. cruzi* infection.

Mem. Inst. Butantan, v. 54, n. 2, 1992.

MANIPULATION OF THE COMPLEMENT SYSTEM BY MICROORGANISMS AND MAN

Michael Kirschfink*

Complement is considered an important mediator of inflammation which occurs as a natural response of the host tissue to any injury (1, 2).

By the activation of the two major pathways, phlogistic peptides like the anaphylatoxins C3a and C5a as well as the membrane attack complex C5b-9 are generated. The effector functions, arising from an activated complement system are potentially harmful — beneficial for the host as an important part of this defense system against microorganisms, but of disadvantage if the destructive potential is directed against his own tissue.

Both targets — microorganisms and man — have developed strategies to evade the deleterious attack of an activated complement system.

Manipulation of Complement by Microorganisms

Microorganisms have evolved a variety of mechanisms to interfere with complement activation or to deviate the cascade reaction to outer membrane sites which prevents access of C3b and/or the lytic C5-9 complex to the vulnerable cytoplasmic membrane (3-5) (table 1).

On certain pathogens, molecules have been identified which share structural or genetic homology with complement proteins. Glycoproteins on Vaccinia virus, Herpes simplex virus and *Trypanosoma cruzi* resemble complement regulators like C4bp, CR1 and DAF, thereby preventing the C3 convertases'assembly. Furhermore, a number of microorganisms is able to take advantage of complement fixation on their surface to again entry into the host cell via complement receptors. Some of them, like Epstein-Barr virus or *Leishmania donovani* express surface molecules with complement-like motifs which enable the pathogens to directly bind to the receptor (table 1).

Manipulation of Complement by Man

Genetic deficiency of complement or complement depletion has been effective in reducing injury in a number of complement-dependent inflammatory models (6). It is therefore believed that the successful inhibition of complement is likely to arrest the disease process.

A variety of synthetic compounds have been tested for their impact on the complement system. Many of the known synthetic complement inhibitors are toxic, not complement specific or require unrealistically high concentrations to inhibit complement *in vivo* (7).

Due to the high specificity and the absence of toxic side effects, the introduction of endogenous complement inhibitors like CR1, DAF or C1-Inhibitor (C1-Inh) appears to be a logical approach to block the complement system *in vivo* (table 2).

* Institut füer Immunologie, Universitaet Heidelberg, Germany
** Correspondence: Michael Kirschfink, DMV, PhD, Institute of Immunology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer, Germany, 6900 Heidelberg, Germany, Fax: 0049-6221-564030

Based on the hypothesis, that in sepsis a relative deficiency of C1-Inh might contribute to the development of fatal complication, substitution with this regulatory protein appears to be of advantage for the clinical outcome (8).

Soluble recombinant CR1 (srCR1) inhibits both the alternative and classical pathway activation in whole serum in a nanomolar concentration range. Serving as a cofactor for the serum protease factor I, srCR1, further acts to promote the degradation of C3b and C4b to inactive forms which no longer bind to srCR1, releasing the regulator to recycle in the inactivation process (9).

In different animal models, the application of srCR1 significantly reduced complement-mediated tissue damage, as shown for myocardial (9) as well as in intestinal (10) ischemia/reperfusion injury, hyperacute graft rejection (11), reverse passive Arthus reaction (12) and adult respiratory distress syndrome (ARDS, 13).

While the administration of srCR1 leads to an entire suppression of the cascade reaction, antibodies directed against the anaphylatoxin C5a target the peptide, which is thought to be responsible for most of the effects seen in complement-mediated tissue damage. In two models of septic shock, by the prophylactic administration of anti-C5a antibodies, the mortality rate was reduced to zero and the animals showed significant improvement of their hemodynamic condition (14, 15).

The problem of a rapid clearance of therapeutic reagents from the blood may be solved by creating chimeric proteins of the inhibitory molecules to other proteins, having longer half-lives, such as immunoglobulins (16).

Although some of the therapeutical strategies seem to be promising, drug designer have to take into consideration that the effective inhibition of complement will deprive the patient of one of his important immunological defense systems.

REFERENCES: 01. Rother, U., Till, G.D. (1988) The complement system. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 02. Müller-Eberhard, H.J. (1988) Molecular organization and function of the complement system, Ann. Rev. Biochem. 57, 321-347. 03. Joiner, K.A. (1988) Complement evasion by bacteria and parasites. Ann. Rev. Microbiol. 42, 201-230. 04. Cooper, N.R. (1991) Complement evasion strategies of microorganisms. Immunol. Today 12, 327-331. 05. Frank, M.M. (1992) The mechanism by which microorganisms avoid complement attack. Curr. Opinion Immunol. 4, 14-19. 06. Rother, K., Rother, U. (1986) Hereditary and acquired complement deficiencies in animals and man. Progress in Allergy 39, Karger Verlag, Basel, London, New York. 07. Asghar, S.S. (1984) Pharmacological manipulation of complement system. Pharm. Rev. 36, 223-244. 08. Hack, C.E., Voerman, H.J., Eisele, B., Keinecke, H.O., Nuijens, J.H., Eerenberg, A.J.M., Ogilvie, A., Strack van Schijndel, R.J.M., Delvos, U., Thijis, L.G., (1992) C1-esterease inhibitor substitution in sepsis. Lancet 339, 378. 09. Weisman, H.F., Bartow, T., Leppo, M.K., Marsh, H.C. Jr., Carson, G.R., Concino, M.F., Boyle, M.P., Roux, K.H., Weisfeldt, M.L., Fearon, D.T. (1990) Soluble human complement receptor type 1: In vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. Science 249, 146-151. 10. Hill, J., Lindsay, T.F., Ortiz, F., Yeh, C.G., Hechtman, H.B., Moore, F.D., Jr. (1992) Soluble complement receptor type 1 ameliorates the local and remote organ injury after intestinal ischemia-reperfusion in the rat. J. Immunol. 149, 1723-1728. 11. Pruitt, S.K., Bollinger, R.R. (1991) The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute allograft rejection. J. Surg. Res. 50, 350-355. 12. Yeh, C.G., Marsh, H.C. Jr.,

Carson, G.R., Berman, L., Concino, M.F., Scesney, S.M., Kuestner, R.E., Skibbens, R., Donahue, K.A., Ip, S.H. (1991) Recombinant soluble human complement receptor type 1 inhibits inflammation in the reversed passive Arthus reaction in rats. J. Immunol. 146, 250-256. 13. Rabenovici, R., Yeh, C.G., Hillegass, L.M., Griswold, D.E., DiMartino, M.J., Vernick, J., Fong, K.L.L., Feuerstein, G. (1992) Role of complement in endotoxin/platelet-activating factor-induced lung injury. J. Immunol. 149, 1744-1750. 14. Smedegard, G., Cui, L., Hugli, T.E. (1989) Endotoxin-induced shock in the rat. A role for C5a. Am. J. Pathol. 135, 489-497. 15. Stevens, J.H., O'Hanley, P., Shapiro, J.M., Mihm, F.G., Satoh, P.S., Collins, J.A., Raffin, T.A.: (1986) Effects of anti-C5a antibodies on the adult respiratory distress syndrome in septic primates. J. Clin. Invest. 77, 1812-1816. 16. Kalli, K.R., Bartow, T.J., Hsu, P., Klickstein, L.B., Ahearn, J.M., Matsumoto, A.K., Fearon, D.T.: (1991) Mapping of the C3b-binding site of CR1 and construction of a chimeric complement inhibitor. Complement Inflamm. 8, 171. 17. Basta, M., Kirschbom, P., Frank, M.M., Fries, L.F. (1989) Mechanisms of therapeutic effect of high-dose intravenous immunoglobulin. Attenuation of acute complement-dependent immune damage in a guinea pig model. J. Clin. Invest. 84, 1974-1981. 18. Moran, P., Beasley, H., Gorrell, A., Martin, E., Gribling, P., Fuchs, H., Gillett, N., Burton, L.E., Caras, I.W. (1992) Human recombinant soluble decay accelerating factor inhibits complement activation *in vitro* and *in vivo*. J. Immunol. 149, 1736-1743. 19. Höpken, U., Oppermann, M., Montz, H., Mohr, M., Burchardi, H., Götze, O. (1992) Treatment of septic shock in pigs with a monoclonal antibody with specificity for a C5a neoepitope. Immunobiol. 184, 430.

TABLE 1: COMPLEMENT EVASION STRATEGIES OF MICROORGANISMS

MECHANISM	MICROORGANISMS
shedding of C3b/C5b-9 or binding of complement proteins to harmles sites	*Salmonella* spp., *E. coli, Neisseria* spp. *Trypanosoma cruzi, Schistosoma mansoni*
destruction of complement proteins by proteases	*Streptococcus* spp.
binding of complement regulators	*Streptococcus* spp.
mimicry of complement regulators (C4bp, CR1, DAF)	Vaccinia virus, Herpes simplex virus, Epstein-Barr virus. *Candida albicans, Trypanosoma cruzi, Plasmodium falciparum*
cell infection via complement receptor, (CR2, CR3, CR4)	Epstein-Barr virus, West Nile virus HIV, *Mycobacterium leprae/tuberculosis Leishmania major/donovani Histoplasma capsulatum,* *Babesia rodhaini*

TABLE 2: STRATEGIES OF COMPLEMENT INHIBITION

APPLIED MOLECULE	ANIMAL MODELS	REFERENCES
CVF	ARDS	13
IgG	Forssman shock	17
srCR1	hyperacute graft rejection	11
	ischemia/reperfusion injury	9,10
	reverse passive Arthus reaction	12
	ARDS	13
srDAF	reverse passive Arthus reaction	18
C1-Inhibitor	septic shock (man)	8
anti-C5a	septic shock	13, 14, 19

Mem. Inst. Butantan, v. **54**, n. 2, 1992.

MANIPULATION OF THE COMPLEMENT SYSTEM BY ANIMAL VENOMS

Denise V. Tambourgi(1), Ana Claudia M. R. Campos(2), Maria Cristina W. de Freitas(2), Fábio Carlos Magnoli(2), W. Dias da Silva(2), Vera Regina Dessimoni von Eickstedt(4), Maria Cristina dos Santos(1), Maria de Fátima D. Furtado(3) and Thereza L. Kipnis(1). — Departamento de Imunologia, ICB, USP(1); Laboratório de Imunoquímica(2) Laboratório de Herpetologia(3) and Laboratório de Artrópodos Peçonhentos(4), Instituto Butantan.

Interaction of Snake Venoms With Complement (C) Components. — Poisonous snakes belong to four families: ELAPIDAE, CROTALIDAE, VIPERIDAE, and HYDROPHYDAE, and their venoms contain a vast number of substances with different biochemical and pharmacological activities. The venom from some members of the ELAPIDAE family contains a 144 KDa glycoprotein, designated cobra venom factor (COF) (H.J. Müller-Eberhard and K.E. Fajëllstrom, J. Immunol. 107: 1666-1672, 1971). This protein interacts with factor B in the presence of Mg^{++}, the resulting COF-B being transformed into the enzymatically active complex COF-Bb upon cleavage of bound B by factor D (N.R. Cooper, J. Exp. Med. 137: 451-460, 1973). COF-Bb cleaves C3 in C3a and C3b fragments. C3a is released into the fluid phase (W. Dias da Silva and I.H. Lepow, J. Exp. Med., 125: 921-946, 1967), while C3b binds to the complex, the resulting COF-BbC3b enzyme being able to form the C5b-C9 cytolytic complex. (Pickering et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62: 521, 1969; Miyama et al., Biken's J. 18: 193, 1975). Related COF protein has not been found in venoms from Brazilian crotalids but their sera contain a serum protein immunochemically related with human C3 (W. Dias da Silva et al., Acta Pathol. Microbiol. Scand, Sect. C: Supll. 284: 97, 1984).

In this communication we are showing that normal human serum (NHS) loses, its hemolytic activity upon incubation with *Micrurus (M. ibiboboca* and *M. spixii), Bothrops (B. jararaca, B. moojeni* and *B. cotiara*) and *Naja (N. melanoleuca* and *N. nigricollis*) but not with *Crotalus (C. durissus terrificus*) venoms, as evaluated by the capacity of the serum samples pretreated with the venoms to lyse sheep red blood cells (Es) optimally sensitized with rabbit serum (A) anti-Es (EsA). Venom from *N. naja*, cleaves C3 in NHS in presence of $5\mu M$ Mg^{++} even in absence of Ca^{++} ions by adding $10\mu M$ EGTA. In contrast, venoms from *M. ibiboboca, N. nigricollis*, and *M. spixii*, only cleave C3 in NHS in the presence of Ca^{++} ions. C consumption and C3 cleavage induced by venom from *N. melanoleuca* apparently was due to a mechanism similar to that described for *N. naja*, since a COF-like molecule was detected in that venom by Western-blot analyses, using as probe monospecific antisera against COF or human C3. Equivalent molecules were not detected in the venoms from the other snakes analysed. These observations indicate that, as venom from *N. naja*, venom from *N. melanoleuca* also activates C and cleaves C3 through activation of the alternative C pathway (AP).

C3 cleavage in NHS by the venoms from *N. nigricollis, M. ibiboboca and Bothrops* could be due to the presence of proteases, since it was observed that these venoms induce cleavage of purified human C3. Proteolytic enzymes, able to cleave casein, were detected in *Bothrops* and, with lesser intensity, in venom from *C. durissus terrificus*. When gelatin was included in a 10% polyacrylamide gel, several very large and 3-4 faint bands with proteolytic activity were detected in *Bothrops* and in *C. durissus terrificus* venoms, respectively, after the electrophoretic separation. Venoms from genera *Micrurus* and *Naja* were unable to

cleave both, casein and gelatin. Venoms from *M. spixii* and *N. nigricollis* had some thrombin-like activity.

In summary: C consumption induced by snake venoms in NHS are due to; a) COF, a glycoprotein detected earlier in venom from *N. naja* and in the present studies in the venom from *N. melanoleuca*, that interacts with factor B in the presence of Mg^{++} ions to generate the complex COF-B potentialy able to be transformed into the C3 convertase COF-Bb, upon cleavage of B in Bb and Ba by factor D, the enzyme responsible for the C3 conversion into C3a and C3b; b) proteolytic enzymes capable of cleaving directly C3 and maybe other C components are present in the venoms from *Bothrops, M. ibiboboca* and *N. nigricollis; c) thrombin-like factors described in the venoms from M. spixii* and *M. nigricollis* may interact with C3 leading the formation of the C5b-C9 complex, as early studies have suggested to occur with human thrombin (M.J. Polley, J. Exp. Med., 150: 633-645 (1979).

Interaction of Spider Venom with C Components: — spiders of the genera *Loxosceles, Phoneutria, Lactrodectus and Grammostola* are largely distributed in South, Central, and North America as well as in the Mediterranean area and Europe. These genera include many species throughout the world, some of them being medically relevant due to the frequency with which the casualty may occur and to the complications which may follow. *Phoneutria's* bite is very painful; loxoscelic poison has proteolytic and hemolytic activities causing large tissues necrosis and hemolysis; *Lactrodectus* causes muscular contractures, violent abdominal colic pain and also intense generalized pain (J.H. Correa Rodrigues et al., Revista HCPA, 6: 91-96, 1986). *Loxosceles* venom appears to be composed of at least eight different proteins, mostly enzymes (B. Elpert et al., Fed. Proc. 223, 1973, Abstract; J. Finke et al., Annual Meeting of The Am. Soc. Mic. p. 97, 1073). The direct lytic action of this venom on red blood cells has been attributed to the sphingomielinase D (L.J. Forrester et al., Arch. Biochem. Biophys. 187: 355-365 (1978) and its dermonecrotic activity to a 35-33 KDa protein (K. Barbaro et al., Toxicon, 30: 331-338, (1992). "In vitro" venom acts directly on cell wall of human strain cells to disrupt its organization causing immediate cell death; "in vivo", venom causes a rapid intravascular coagulation and occlusin of small cappilaries followed by necrosis of skin. As the coagulation cascade proceedes, other inflammation mediators are formed, the vascular permeability is increased and platelets are trapped over the endothelial cells (P.C. Anderson et al., Mo. Med. 74: 549-552 (1977). Animals injected in the skin with *L. reclusa* venom showed an immediate and local edema, hemorrhage and necrosis. Based on the analogy of these events with those observed in the classical Arthus phenomenon, it was suggested that the C system could play a role in the induction of the lesions in spiders bite (C.W. Smith et al, Lab. Invest., 22: 90-93, 1970).

In this report we present evidence that venoms from *L. gaucho and Phoneutria* consume, also in a dose — related fashion, human C by activating both the classical (CP) and AP pathways. Evidences for that were the pronounced loss of the capacity of the human serum samples, pretreated with various amounts of venom for 1h at 37º C, to lyse EsA or rabitt blood cells (Er). The biochemical and functional characterization of the molecule(s) involved in this events are in process.

The data presented in this communication together with those described in early studies, should be taken into consideration in the interpretation of the mechanisms involved in the pathogenesis of tissue lesions produced by animal venoms.

Mem. Inst. Butantan, v. **54**, n. 2, 1992.

THE ROLE OF COMPLEMENT IN THE PATHOGENESIS OF HIV INFECTION

M. D. Kazatchkine*

CD4 serves as the primary receptor for HIV on T lymphocytes and may be important for viral entry into CD4+ monocyte/macrophages and dendritic cells. Infection of CD4+ cells *in vitro* has been shown to be facilitated by anti-HIV antibodies through Fc receptor-mediated enhancement and by serum from HIV-infected subjects through mechanisms involving both Fc and complement receptors. Recent studies have also shown that a number of CD4- cells are susceptible to HIV infection *in vivo* and *in vitro*, indicating that alternative pathways to CD4 exist for viral penetration and that the host cell range of HIV is broader than originally described.

Complement Activation By HIV.

Intact HIV, recombinant gp 160 of HIV and HIV-infected cells have been shown to activate complement in human serum resulting in the cleavage of C3 and subsequent deposition of C3 fragments on the viral surface or on the surface of infected cells. Complement activation by HIV occurs through the classical pathway following the binding of C1q to conserved peptidic sequences of gp41 and direct activation of the C1 complex. Although activation of C1 by gp41 and by gp160 may occur in the absence of antibodies, it is significantly enhanced by anti-HIV envelope IgG. Under optimal experimental conditions, classical activation pathway by mammalian-derived recombinant gp 160 results in the deposition of one molecule of C3b/IC3b per molecule of gp160. Deposition of C3 fragments on the envelope glycoprotein complex provides the basis for antibody-dependent and independent complement-mediated enhancement of infection of C3 receptor-bearing cells.

Complement-mediated Enhancement of Infection of T Lymphocytes.

Recent studies have indentified the presence of CR1 and CR2 on subsets of human peripheral blood T lymphocytes and of CR2 on thymocytes. CR1 is expressed on approximately 15% of peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells. CR1 + T lymphocytes also express Fc gamma receptors as assessed by their ability to bind fluoresceinated aggregated IgG. Most CR1+ T cells also express CR2 is expressed on 50% of both CD4+ and CD8+ peripheral blood T lymphocytes at an approximately 10 fold lower density than on B cells. On the human T cell line HPB-ALL, CR2 and CR1 are co-internalized when cross-linked with anti-receptor antibodies: CR2 is capable of signal transduction.

The first evidence for the role of complement is enhancing HIV infection of T cells came from the observation by Robinson that sera from more than 80% of HIV antibody-positive individuals increased infections virus release from cells of

* Unité d'Immunopathologie — Hôpital Broussais — Paris — França

the MT2 T cell line upon infection with HIV-1 *in vitro*. Enhancement of CD4+ CR2+ infection by seropositive serum required complement, anti-HIV antibodies and the CD4 molecule. We have subsequently found that complement alone (i.e. in the absence of anti-HIV antibodies) was capable of enhancing infection of MT2 cells with suboptimal amounts of HIV-1; productive viral infection of MT2 cells with low inputs of HIV that had been pre-opsonized with normal human HIV-seronegative serum occurred through the interaction of opsonized virus with CR2, since infection was blocked by cross-linked mAb against CR2 but not by a mAb against the gp120 binding site of CD4. Complement alone was also shown to enhance infection of normal peripheral blood T lymphocytes as assessed by its ability to enhance infection of PHA-stimulated seronegative peripheral blood leucocytes cocultured with leucocytes from HIV-infected individuals.

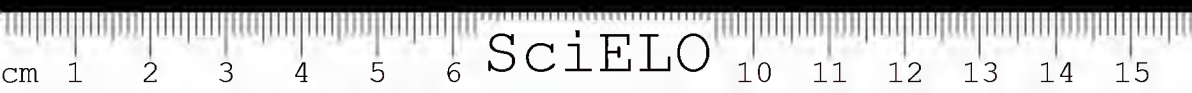
Preliminary evidence indicates that blocking of CH1 partially decreases CD4-dependent infection of the CD4+ CD8+ Cr1+ CR2+ HPB-ALL cell line with complement-opsonized HIV. CR1 on T cells could either function as a receptor mediating viral entry into the cells or as a cofactor for the cleavage of C3b into iC3b and C3dg to allow the interation of opsonized virus with CR2.

Complement-Mediated Enhancement of Infection of Monocyte/Macrophages.

Monocyte/macrophages represent a major reservoir of virus in HIV-infected individuals. The cells express CD4 at low density on the membrane. Depending on their state of maturation, cells of the monocytic lineage also express various amounts of Fc gamma RI (CD64), Fc gamma RII (CD32) and Fc gamma RIII (CD16) receptors, LFA-1 (CD11a/CD18), CR1 (CD35) and CR3 (CD11b/CD18). Complement enhances *in vitro* infection of monocyte/macrophages with HIV in the presence and in the absence of antibodies. We have recently demonstrated that complement enhances the productive infections of cultured normal peripheral blood monocytic of the promonocytic cell line THP-1, and of the cell line MonoMac 6 with HIV-1 and HIV-2. The cells and cell lines express CR1 and CR3. Cultured monocytes and THP-1 cells express low amounts of CD4 whereas MonoMac 6 cells do not express CD4 antigen nor Cd4 transcript. Thus, the enhancing effect of complement on infection of cells of the monocytic lineage may occur independently of CD4, indicating that the interaction of opsonized virus with complement receptors may be sufficient to mediate penetration of HIV into monocytes. Preincubation of target monocytic cells with F(ab)2 fragments of anti-CR1 antibodies or of monoclonal antibodies directed against the alpha chain of CR3 (but not against the alpha chain of LFA-1) suppressed infection of the cells with complement opsonized HIV.

Complement-Mediated Enhancement of Infection of B Lymphocytes.

EBV-transformed human B cell lines, EBV-cell lines and EBV-bearing normal human B lymphocytes are susceptible to HIV-infection *in vitro*. B lymphocytes are activated in HIV infected-individuals. There is no evidence, however, that normal B lymphocytes may be infected with HIV *in vitro* or *in vivo*. Lymphoblastoid B cell lines expressing CR2 and, for some of the lines also express CR1. The expression of CR2 is upregulated by EBV in EBV-transformed B cell lines. All normal mature B lymphocytes express CR1 and CR2.

Early studies have shown that EBV-transformed human B cell lines are susceptible to HIV infection *in vitro*. Depending on the cell line and on the strain of HIV, infection EBV+B cell has resulted in cell lysis or in persistent non-productive or productive infection. HIV has also been shown to infect EBV-Burkitt lymphoma

B cells lines, indicating that susceptibility to HIV infection is not strictly dependent on the presence of the EBV genome. We have recently demonstrated that CR2 maybe mediated on its own the productive infection of cells of the Raji B lymphoblastoid cell line with complement-opsonized HIV. Infection of the cells occurred independently of antibodies and of CD4 molecule since HIV-seronegative serum was used for infection and since the cells lack the expression of CD4 surface antigen and of CD4 transcript.

Enhancement of HIV-infection by complement may contribute to extend the range of target cells for the virus and to increase the rate of infection in patients with a low viral load. Complement-dependent enhancement also allows infection of cells independently of the monocytotropic or lymphocytotropic characteristics of the infective strain. The role of complement in facilitating HIV-infection should be taken into consideration in the design of vaccines and of therapeutic trials.

Mem. Inst. Butantan, v. **54**, n. 2, 1992.

COMPLEMENT DEFICIENCIES

Anete Sevciovic Grumach*

The evaluation of Complement deficiencies (CD) in man has lead to increased knowledge about the biological activity of this System that would not have ocurred by means of "in vitro" observations.

Complement Deficiencies were first described in healthy animals and humans, during decade of 1960 and the protective function of the complement system was not considered important (1).

In the beginning of 1970, inherited and acquired CD were associated with severe bacterial infections and auto-immune diseases. The defense function was established after the description of a C3 deficient patient presenting with severe bacterial infections, similar to hypogammaglobulinemic patients (2). The frequencies for complement components deficiencies are listed in Table I according to several authors. National surveys for Immunedeficiencies detected less than 1% of primary ID patients with CD in Japan and Sweden (3, 4), while in our experience this number approximates 5% (Figure 1) (5).

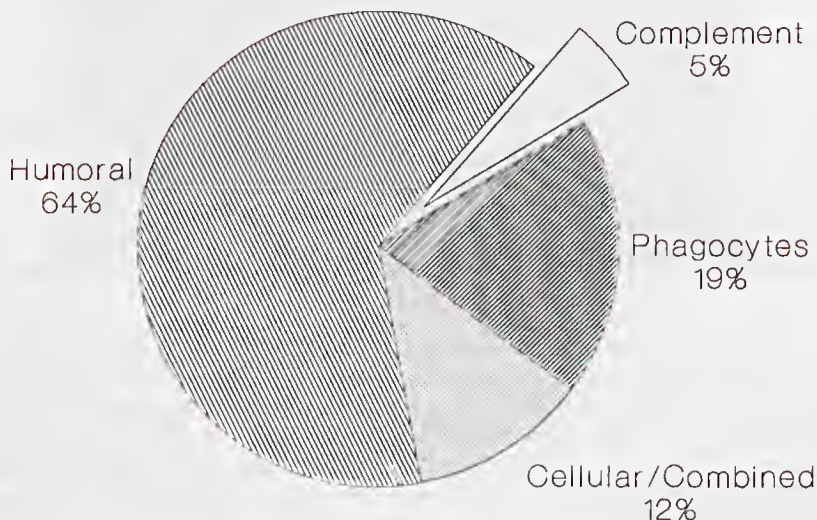



FIG. 1 Primary immunodeficiencies in Dept. of Pediatrics, Faculty of Medicine, University of São Paulo (n = 140)

Chromosomal location of most complement component genes have been determined. C4A and C4B genes are located near MHC and this association is related to a higher susceptibility to auto-immune diseases. (1) (TABLE II)

* Dept. of Pediatrics, Faculty of Medicine, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

TABLE I
PREVALENCE OF COMPLEMENT DEFICIENCIES

Component	Prevalence
C2	1:10.000 /1:30.000 (caucasians)
C4	complete: rare incomplete: 1:250
C6	1:60.000 (caucasians)
C7	1:25.000 (japanese)
C9	1:1.000 (japanese)
C1-INH	1:150.000

References: Sjöholm AG 1990 (1); SC. ROSS & P. DENSEN, 1984 (8) CD WEST 1989 (13)

TABLE II
CHROMOSOMAL LOCATION OF COMPLEMENT COMPONENTS

Components	Chromosome
C1q, C8, C4bp, Factor H, CR1, CR2, DAF	1
C1r, C1s	12
C3	19
Factor I	4
C1-INH	11
C4A, C4B, C2, B (MHC)	6

Reference: AG SJÖHOLM, 1990 (1); AS GRUMACH, FFM CASTRO & M KIRSCHFINK, 1992 (6)

Deficiencies of the first components of the classical component pathway are mainly associated with auto-immune diseases. Inherited *C1q deficiency* was described in 40 patients with 60% of them presenting with failure in C1q synthesis (B chain) and 40% with disfunctional molecule (7). Only 10 patients were described with *C1r and C1s deficiency*, most of them having both components affected, probably due to genetic relation between C1r and C1s. C1r is absent and serum concentration of C1s is reduced to about 20-40% (6).

C4 is codified by two polymorphic genes, inside MHC, which originate from two isotipic, C4A and C4B. *Complete deficiency of C4* requires inheritance with allele nulls in both C4 loci. Only 16 cases have been described to date (7,8). Nevertheless, single null alleles are common in both loci, frequently resulting in heterozygotic deficient persons. About 60% of the human population have four active genes, so, partial C4 deficiency is one of the most common human immunodeficiencies (1). *Partial C4 deficiency* is associated with HLA-DR3 and greater susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus (SLE). (9)

Severe and early Systemic Lupus Erythematosus was described in C4A deficient patients and bacterial meningitis caused by *H. influenzae* in children was related to C4B deficiency. C4A is envolved with the manipulation of immunecom-

plexes and C4B is linked to the polyssacharides present in bacterial surfaces (9). *C2 deficiency* is also associated with Systemic Lupus Erythematosus Lupus as are C1 and C4, but 25% of C4 deficients are healthy.

C3 deficiency was described in only 16 patients. One patient, a boy, was followed in our Department of Pediatrics (São Paulo, Brazil). The diagnosis was confirmed with the collaboration of Prof. Wilmar Dias da Silva. The clinical manifestations were present early in his life in the form of recurrent infections: pneumonia, otitis, meningitis and pioarthritis. The inheritance was autossomic codominant, with C3 intermediate levels in other relatives (Figure 2) without symptoms (10). This complement component, as C4, presents a electrophoretic polymorphism with slow and fast patterns as shown in Figure 3.

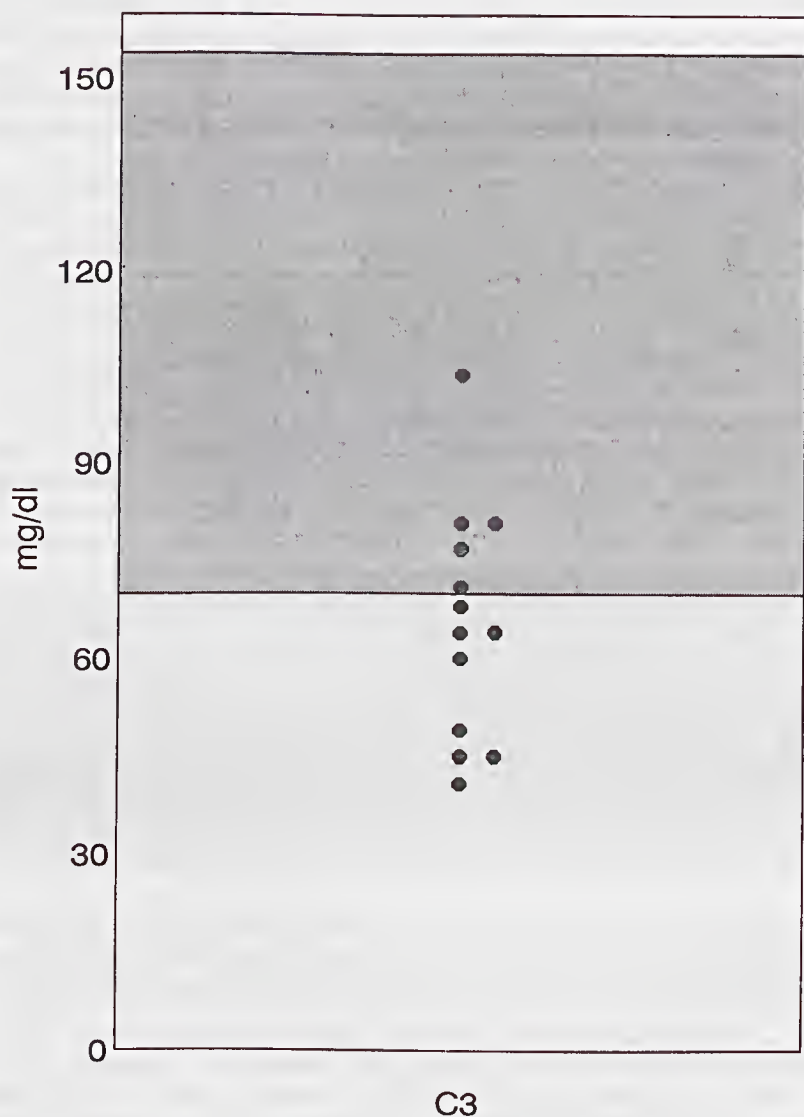



FIG. 2. C3 levels in relatives of homozygous C3 deficient patient, described by GRUMACH et al. (1988).

Association of C3 with IgG2 deficiency, resulting in severe infections was described recently. Some other patients had SLE and nephropathy associated with this condition (10).

Terminal components of complement system (C5-C8) are associated with recurrent infections due to *Neisseriae meningiditidis* and *gonorrhae*. These infections are caused by uncommon serogroups, frequently associated with septicemia in children over 10 years of age. Other diseases mediated by immune — complexes also can be associated. No clinical manifestation were described in C9 deficient states (8,11).

Absence of *Factor D* recently was found in a male patient with recurrent infections by *Neisseriae* (1).

Different types of *properdin* deficiency were reported in Scandinavia, the Netherlands and Israel (n=53):0.5% of normal properdin levels, about 10% of normal values and disfunctional protein. These deficiencies were described in healthy people, in patients with late meningoccocal infections (45%), with Systemic Lupus Erythematosus and with recurrent pneumococcal infections. The immunization of these patients against *Meningococcus* prevents meningitis by stimulating opsonization resulting in bacterial death (12).

Deficiency of *regulatory proteins* of the Complement System such as C1-INH may result in edema of respiratory and gastrointestinal tracts. This condition is called hereditary angioedema with the most common forms being either low C1-INH levels or dysfunctional C1-INH. The skin, mucosal membranes, extremities, face, airways and digestive tract may be envolved. Trauma, stress, fatigue, infections or no cause at all are associated with its onset. Classical urticaria is not seen, but some skin problems may be seen in 25% of these cases (i.e. erythema marginatum or multiform). Therapy is directed at both prevention and treatment of the disease. Sometimes narcotics are necessary for severe abdominal pain. Treatment with fresh plasma is not advised for low C1-INH concentrations and the presence of its substrate (C1). Tracheostomy may be necessary for glottis edema. Androgens, as danazol, have been recommended in preventive treatment, with unknown mechanism of action. Epsilon aminocaproic accid as plasmin inhibitor

A B C D E F G H I J K L M N O P

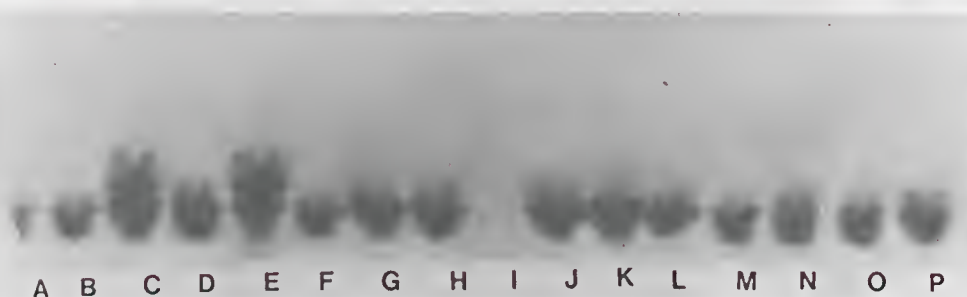
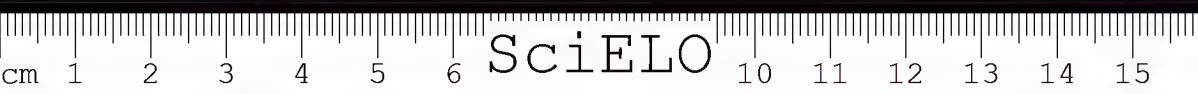



FIG. 3 Electrophoretic demonstration of C3 polymorphism in the family of the C3-deficient proband. Electrophoresis was carried out in agarose. The slow-pattern precipitation line (SS) is closest to the negative pole, whereas the fast pattern (SF) is above. A, Maternal grandmother: S-, B, maternal uncle: SS, C, maternal uncle: SF, D, maternal aunt: S-, E, maternal aunt: SF, F, father: S-, G, brother: S-, H, brother: SS, I, proband:--, J, paternal grandmother: S-, K, paternal grandfather: SS, L, paternal aunt: S-, M, paternal uncle: S-, N, mother: S-, O, mother: S-, P, father: S-. The precipitation lines shown in the lower part of the picture close to the negative pole present the slow pattern. One cm above is the fast pattern.

has been prescribed, with some adverse effects in muscles and by causing thrombosis (6,13).

Complement receptor deficiencies have been described for CR1, CR3 and CR4. CR1 and CR3 deficiencies were verified in SLE patients. CR3 and CR4 belong to a family of adhesion molecules, the integrins. The lack of beta 2 subunit of the dimeric molecule is associated with severe bacterial infections, due to impaired adherence of inflammatory cells to the endothelium and to impaired phagocytosis. This disease was named leukocyte adhesion deficiency. The clinical manifestations are late umbilical cord fall, bad cicatrization, severe bacterial infections, leukocytosis and injured leukocyte function (9), (6, 14).

In general, the treatment of complement deficiencies is restricted to environmental care, vaccination, fresh plasma and gammaglobulin when IgG subclasses are also deficient (6). Although few therapeutic resources are available, the patients have satisfactory evolution and no death was observed in our experience (even in the C3 deficient patient).

REFERENCES: 1) SJOHÖLM AG Inherited complement deficiency states: implications for immunity and immunological disease APMIS 98:861-874, 1990. 2) ALPER CA, COLTEN HR, ROSEN FS, RABSON AR, MACNAB GM & GEAR JSS Homozygous deficiency of C3 in a patient with repeated infections Lancet 2:1179-1181, 1972. 3) HAYAKAWA H, IWATA T, YATA J & KOBAYASHI N Primary immunodeficiency syndrome in Japan. I. Overview of a nationwide survey on primary immunodeficiency syndrome. Journal of Clinical Immunology 1: 31- 39, 1981. 4) FASTH A Primary immunodeficiency disorders in Sweden: cases among children, 1974-1979. Journal of Clinical Immunology, 2:86-92, 1982. 5) CARNEIRO-SAMPAIO MMS, GRUMACH AS, MANISSADJIAN A Laboratory screening for the diagnosis of children with primary immunodeficiencies J Invest Allergol Clin Immunol 1(3): 195-200, 1991. 6) GRUMACH AS, CASTRO FFM, KIRSCHFINK M Deficiências do sistema complemento IN CARNEIRO-SAMPAIO MMS & GRUMACH AS Alergia e Imunopatologia em Pediatria, Sarvier, São Paulo, 1992, pp 169-178. 7) ROTHER K Summary of Reported Deficiencies Progr Allergy vol. 39, Kerger, Basel, 1968, pp 202-211. 8) ROSS SC & DENSEN P Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immunodeficiency. Medicine, 63:243-273, 1984. 9) FRANK MM Complement: a brief review J Allergy Clin Immunol 84(4), Part 1: 411-420, 1988. 10) GRUMACH AS, VILELA MMS, GONZALEZ CH, STAROBINAS N, PEREIRA A, DIAS-DA- SILVA V & CARNEIRO-SAMPAIO MMS Inherited C3 Deficiency of the Complement System Brazilian J Med Biol res 21:247-257, 1988 11) GUENTHER LC Inherited disorders of complement J Am Acad Dermatol 9(6): 815-839, 1983. 12) SJOHÖLM AG, KUIJPER EJ, TIJSSEN CC, JANST A, BOL P, SPANJAARD L, ZANEN HC Dysfunctional properdin in a Dutch family with meningococcal disease N Engl J Med 319(1):33-37, 1988. 13) WEST CD The Complement Profile in Clinical Medicine Complement in Laboratory Medicine — Complement Inflamm 6:49-64, 1989. (14) MORGAN BP & WALPORT MJ Complement deficiency and disease Immunol Today 12(9):301-306, 1991

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

Volume 54, 1992

Mem. Inst. Butantan	v. 54	n.1, 2	p. 1—19	1992

ÍNDICE DE AUTOR/AUTHOR INDEX
VOL. 54

GOVERNO DE SÃO PAULO
CONSTRUINDO UM FUTURO MELHOR

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. Somente serão aceitos trabalhos inéditos e que se destinem exclusivamente à revista. É proibida a reprodução com fins lucrativos. Os artigos de revisão serão publicados a convite da Comissão Editorial.
2. Os trabalhos deverão ser redigidos em português, inglês ou francês, datilografados preferencialmente em máquina elétrica, em espaço duplo em 3 (três) vias, em papel formato ofício e numerados no ângulo superior direito.
3. No preparo do original será observada, sempre que possível, a seguinte estrutura: **Página de rosto:** título do artigo, nome(s) do(s) autor(es) e filiação científica. **Texto:** introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referência bibliográfica. **Material de referência:** resumos (em português e inglês); **unitermos**: palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo; devem ser incluídas até um limite máximo de três, em português e inglês.
4. As referências bibliográficas deverão ser ordenadas alfabeticamente e numeradas.
   Exemplos:
   Para livros: autor, título, edição, local de publicação, editor, ano, páginas.
   7. BIER, O. **Microbiologia e imunologia.** 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Para artigos: autor, título do artigo, título do periódico, volume, página inicial e final, ano.
   8. MACHADO, J.C., SILVEIRA F°, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. **Mem. Inst. Butantan**, **v.40/41**, p. 1-9, 1976/77.
   As citações no texto devem ser por números-índices correspondentes às respectivas referências bibliográficas
   Exemplos:
   ...método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ...segundo vários autores[2,3,4]
5. As ilustrações (fotos, tabelas, gráficos etc.) deverão ser originais e acompanhadas de legendas explicativas. As legendas serão numeradas e reunidas em folha à parte. Os desenhos deverão ser a nanquim e as fotografias bem nítidas, trazendo no verso o nome do autor e a indicação numérica da ordem a ser obedecida no texto. As ilustrações deverão ser organizadas de modo a permitir sua reprodução dentro da mancha da revista (22 x 12,5cm).
6. Os artigos deverão conter no máximo 6 (seis) ilustrações (branco e preto). De cada trabalho serão impressas 30 (trinta) separatas, sendo 10 para a Biblioteca do Instituto e 20 para os autores.
7. Os textos originais não serão devolvidos e os originais das ilustrações estarão à disposição dos autores.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

1. Manuscripts submitted to the Editorial Board should be unpublished texts and should not be under consideration for publication elsewhere. Reproduction for commercial purposes is not allowed. The Editorial Board will plan the publication of revision articles.
2. The original and two copies of papers should be typewritten in Portuguese, English or French, double spaced, on typing paper (31 x 21cm). Pages should be numbered consecutively at the upper right corner
3. The following structure should be considered in the preparation of the manuscript: **Title page:** with article title, name of author(s), professional address. **Text:** with introduction, material and methods, results, discussion, conclusions, acknowledgments, references, abstracts (in Portuguese and English), and keywords. A maximal number of 03 keywords should be included in Portuguese and English.
4. References in alphabetical order should be numbered consecutively.
   Examples:
   Books:
   7.BIER, O. **Microbiologia e imunologia.** 24.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Articles:
   8. MACHADO,J.C., SILVEIRA F°, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. **Mem.Inst. Butantan**, **v.40/41**, p. 1-9, 1976/77.
   Citations in the text should be identified by the reference number.
   Examples:
   ...método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ...segundo vários autores[2,3,4]
5. Illustrations (photographs, tables, figures etc.) should be the originals and legends should be submitted typewritten on a separate sheet. Line-drawings should be with China ink and photographs must be of top quality. On the back of each figure of photograph the name of the author(s) should be lightly written and the number indicating the sequence in the text. Illustrations should fit in a page measuring 22 x 12,5cm.
6. No more than 6 illustrations will be accepted and photographs should be black and white. Thirty reprints of each article are provided without charge, and 10 will be kept at the library.
7. Submitted manuscripts will not be returned to the author(s) but the original illustrations are available to author(s) by request.